LUCIAN GAVRILĂ • IOAN DĂBALĂ

DESCIFRÎND TAINELE EREDITĂŢII

VOL. I

Coperta de EPAMINONDA TIOTIU

LUCIAN GAVRILĂ • IOAN DĂBALĂ

DESCIFRÎND TAINELE EREDITĂȚII

VOL. I

EDITURA DACIA
CLUJ-NAPOCA 1981

Blank page intentionally inserted

PREFAȚĂ

Nu există un alt domeniu al biologiei atît de dinamic ca cel al geneticii. Iar sarcina de a scrie o carte de Genetică este foarte dificilă, căci menținerea în actualitatea documentării reprezintă o adevărată cursă contra-cronometru, datele științifice, unele de rutină, iar altele foarte noi, sau chiar nebănuite pînă deunăzi, apărînd printr-un adevărat fenomen de avalanșă informațională.

Totodată fenomenul ereditar este extrem de complex, iar știința eredității reprezintă un domeniu în care trecerea de la teză la antiteză și sinteză, într-o desfășurare profund dialectică, este un loc comun.

Ultimul deceniu a însemnat pași enormi în aprofundarea studiului fenomenului ereditar. Datele mai vechi despre replicarea semiconservativă a ADN au fost completate cu modele noi, demonstrîndu-se realitatea unei replicări segmentare, discontinue. A fost demonstrată transmiterea informației ereditare de la ARN la ADN, aducîndu-se astfel un serios amendament la dogma centrală a biologiei moleculare. S-au obținut rezultate remarcabile în studiul structurii moleculare a cromozomului de tip eucariot, bandarea cromozomală reprezentînd o veritabilă „bombă cu oxigen" pentru citogenetică.

S-a dovedit că genele prezintă secvențe codificatoare, transcrise și traduse și secvențe intercalate printre secvențele codificatoare și care sînt transcrise dar nu sînt traduse, genele avînd deci o structură mozaicată. De asemenea, la bacteriofagi s-a demonstrat fenomenul acoperirii de gene. S-au descifrat proprietățile genelor săritoare și s-a elaborat ipoteza oncogenei.

Rezultate de excepție au fost obținute într-un domeniu nou al geneticii moleculare, cel al manipulării de gene cunoscut și sub denumirea de inginerie genetică. Cu acesta Genetica capătă nebănuite implicații de ordin științific, economic, social, politic și chiar moral, iar unele realizări epocale din domeniul ingineriei genetice pot fi comparate ca grandoare și insolit cu

măreția pașilor lui Armstrong pe lună. Știință cu profunde rezonanțe umaniste, Genetica demonstrează unicitatea fiecărui individ uman, irepetabilitatea sa spațio-temporară. Totodată, genetica aduce în discuție, de data aceasta pe temeiuri materialist-dialectice, existența unui destin. Și acest destin se numește destin genetic. El se împlinește cu rigoare matematică, fără a avea însă implacabilitatea destinului uman din mitologia greacă.

Concepută după un plan original, cartea de față reprezintă o încercare, în limitele unui spațiu redus, de a da cititorului o imagine integrală asupra fenomenului ereditar. În intenția autorilor a stat pe de o parte prezentarea cît mai completă a datelor clasice și a datelor moderne privind fenomenul ereditar ca și o încercare de interpretare a datelor de genetică clasică, formală, prin datele geneticii moleculare. Evident, cartea de față este una din variantele posibile.

Pentru documentare ne-am folosit de posibilitățile pe care ni le-au oferit biblioteca Facultății de biologie a Universității din București, biblioteca departamentului de Biologie și Biochimie al Universității Harvard (S.U.A.) precum și schimbul internațional de lucrări științifice, astfel încît autorii au avut posibilitatea de a consulta multe lucrări originale de genetică clasică sau modernă.

Autorii exprimă gratitudine tuturor acestor instituții și tuturor celor care le-au oferit, pe o cale sau alta posibilitatea documentării.

Bibliografia este selectivă și totodată cuprinde lucrările principale devenite clasice ale geneticii formale și moleculare. Din motive de spațiu nu s-a realizat o permanentă corelare a citării în text a autorilor cu bibliografia finală.

Lucrarea se adresează specialiștilor în genetică, studenților facultăților de biologie, medicină și agronomie precum și profesorilor de biologie și elevilor de liceu. De asemenea, ea poate fi consultată de oricine este interesat în descifrarea miraculosului fenomen ereditar, cunoștințele despre ereditate făcînd parte integrantă din ceea ce se poate numi formația intelectuală a omului modern.

AUTORII

CUPRINS

Capitolul I

SUBSTRATUL MATERIAL AL EREDITĂŢII

Motto:

Spirala este esenţa vieţii*

Goethe

1. DEFINIREA EREDITĂŢII

Încă din anul 1863 Spencer defineşte ereditatea ca fiind procesul care determină asemănarea dintre părinţi şi descendenţi. Ulterior, la 1885, A. Weismann înţelege prin ereditate „transferul de la o generaţie la alta a unei substanţe cu o constituţie moleculară definită". Prin aceasta Weismann devansează cu aproape trei sferturi de veac, concepţia modernă despre o bază moleculară a eredităţii, iar conceptul său de *plasmă germinativă,* cu ierarhia structural-funcţională determinanţi-*biofori-idante-ide,* este comparabil cu conceptul actual asupra ierarhiei sistemului ereditar care porneşte de la perechea de nucleotide şi ajunge la *genom.*

Astăzi prin ereditate se înţelege conservarea specificităţii unui sistem biologic dat, în timpul reproducerii sale, conservare care asigură continuul în evoluţie, legătura organică dintre generaţii, adică asemănarea dintre acestea. Totodată, pe lîngă conţinutul evolutiv, apare ca fenomen biologic fundamental, starea de neasemănare, de discontinuitate evolutivă, adică variabilitatea, cea mai generală lege a naturii. Cele două procese, conservatismul ereditar şi variabilitatea ereditară sînt două laturi inseparabile care definesc unitatea dialectică a organismu-

---

* Acest panseu al celebrului autor al lui Faust poate fi luat, în lipsa uneia exacte, drept definiţie a vieţii. Geniul marelui poet a pătruns esenţa vieţii, de vreme ce Terra, singura planetă pe care sălăşuieşte în mod cert Viaţa se află într-o galaxie de formă spirală, iar macromoleculele din interacţiunea cărora irumpe triumfătoare Viaţa au şi ele în esenţă o structură spirală. (L. Gavrilă — Simpozionul, Progrese şi Perspective în biologie: Progrese în Genetica moleculară — Bucureşti, 9 aprilie 1981.

lui viu. Fiecare organism are propria sa ereditate înscrisă codificat în structuri moleculare specifice sub formă de informație ereditară. Cu studiul eredității și variabilității se ocupă Știința Eredității numită încă Genetica. Ea studiază mecanismele înregistrării, reduplicării și modificării informației ereditare precum și ale funcționării materialului ereditar în controlul proceselor biosintetice din organism care conduc la conturarea diferitelor caracteristici ale acestuia.

Cuvîntul ereditate este de origine latină (*hereditas* = a moșteni) și semnifică transmiterea din generație în generație, nu a unor caractere ca atare, ci a capacității de a dezvolta aceste caractere la descendenți.

Cuvîntul Genetică, dat acestei științe de către W. Bateson, în 1905, provine de la grecescul *gennao* care înseamnă a da naștere, a genera. Principiile de bază ale Geneticii au fost formulate în anul 1865 de către Gregor Mendel în lucrarea „Über die Pflanzen hybriden“ și au la bază conceptul de *factori ereditari* (gene) de natură materială. Ele au fost elaborate în urma unor experiențe de hibridare efectuate între diferite soiuri de mazăre. Fără a cunoaște care este natura chimică a factorilor ereditari, Mendel a stabilit, prin interpretarea corectă a rezultatelor experiențelor de hibridare, prin analiza fenotipică, indirectă a factorilor ereditari, dublată de analiza statistică, comportamentul acestor factori ereditari în condiționarea și transmiterea caracterelor ereditare. Uitate pentru mai bine de trei decenii, principiile elaborate de Mendel au fost confirmate la începutul secolului nostru, dovedindu-se a fi universal valabile în lumea vie. Mendel trebuie astfel considerat fondatorul celei mai moderne științe biologice — Genetica. Legînd factorii ereditari mendelieni de cromozomi și dezvoltînd principiile mendeliene de ereditate, școala lui Morgan a elucidat desfășurarea fenomenului ereditar la nivel celular, constatîndu-se existența unui comportament identic al factorilor ereditari mendelieni și al cromozomilor în timpul diviziunii celulare. Rămînea încă nedescifrată natura chimică a factorilor ereditari. Deși în anul 1924, Feulgen și Rossenbeck evidențiază, printr-o metodă selectivă de colorare cu leucofuxină prezența la nivelul nucleului celular și al cromozomilor a acidului dezoxiribonucleic (ADN) nu s-a putut stabili nici o relație dintre acastă substanță și factorii ereditari, a căror localizare pe cromozomi fusese clar demonstrată de școala lui Morgan.

2. DEFINIREA SUBSTRATULUI CHIMIC AL EREDITĂȚII

În procesul de transmitere a caracterelor ereditare de la o generație la alta nu are loc o transmitere ca atare a unui caracter. Este de neimaginat bunăoară transmiterea la nivelul zigotului uman a „ochilor albaștri“. Dar la nivelul acestui zigot „ceva“ a fost transmis și acest „ceva“ va face ca în dezvoltarea ulterioară a embrionului uman să apară manifest caracterul „ochi albaștri“. Ce este acest „ceva“ și care sînt proprietățile sale? Făcînd o paralelă între legile fizicii și legitățile fenomenului ereditar, E. Schrödinger, în 1943, devansînd concepția modernă moleculară despre ereditate, a ajuns la concluzia că genele își păstrează structura lor de-a lungul generațiilor, deoarece cromozomul în care ele se află, reprezintă un fel de cristal stabil aperiodic, compus dintr-o succesiune de elemente izomerice, caracterizate de permanență și a căror natură exactă este de fapt legată de codul genetic.

Trei trepte experimentale au dus la descoperirea acelui „ceva“ adică a substratului material al eredității care s-a dovedit a fi substanța chimică macromoleculară ADN.

Prima treaptă este reprezentată de experiențele medicului englez Griffith efectuate în 1928 cu agentul pneumoniei — *Diplococcus pneumoniae* sau pneumococ. Această bacterie se prezintă sub forma a două tipuri diferite: unul virulent și încapsulat, altul nevirulent și neîncapsulat. Caracterele de virulent și nevirulent sînt ereditare adică se transmit constant de la o generație celulară la alta.

Tipul virulent a fost notat cu „S“ deoarece, crescut pe agar formează colonii netede (în engleză *smooth* = neted). Celulele sale sînt înconjurate de o capsulă formată din polizaharide specifice încît există pneumococi, de diferite tipuri serologice S_{I}, S_{II}, S_{III}.

Tipul nevirulent nu prezintă capsulă și formează pe agar colonii rugoase. El a fost notat cu „R“ (*rough* = aspru).

În mod spontan forma S se poate transforma prin mutație în forma R cu o frecvență foarte mică dar niciodată nu are loc mutația spontană în sensul $R \rightarrow S$. Rezultă deci că prin mutație naturală tipul R provenit din diferitele tipuri serologice ale lui S poate fi R_{I}, R_{II}, R_{III}.

Injectînd la șoareci pneumococi cu diferite variante experimentale, Griffith a constatat că:

1. Tipul virulent „S“ produce boala și animalele mor;

2. Tipul virulent „S“ omorît prin fierbere nu produce boala;

3. Tipul nevirulent „R“ nu produce boala;

4. Dacă la același șoarece se injectează simultan tipurile din variantele 2 și 3 animalul prezintă boala și moare. Din asemenea animale s-au putut izola celule vii capsulate și deci virulente de pneumococ. Experiența a fost riguros efectuată, excluzîndu-se posibilitatea învierii celulelor de tip *S* omorîte prin fierbere, încît s-a impus o singură concluzie: celulele vii ale tipului *R* nevirulent în amestec cu celulele moarte ale tipului *S* se transformă în celule virulente. Fenomenul a fost numit *TRANSFORMARE GENETICĂ*.

Transformarea genetică se desfășoară cu precizie, păstrîndu-se tipul serologic inițial: dacă în amestecul injectat au intrat celule de tip S_{I} omorîte prin fierbere și celule R_{II} vii, din animale vor putea fi izolate celule de tip S_{I} vii și celule R_{II}. Dintr-un asemenea amestec nu vor putea fi izolate celule de tip S^{I}_{II} sau S_{III}. Acest lucru ar fi posibil numai în urma unui fenomen de mutație spontană, dar un asemenea eveniment este pe de o parte foarte rar și necesită pe de altă parte un timp cu mult mai îndelungat decît durează experiența de mai sus.

Celulele virulente de tip S_{I} rezutate prin transformarea celulelor nevirulente de tip R_{II} aflate în prezența celulelor *S* omorîte prin fierbere transmit cu fidelitate, în generațiile celulare ulterioare, caracterul de virulență. Transformarea are astfel caracter permanent, virulența fiind înscrisă în baza ereditară a celulelor R_{II}. Griffith nu a putut da o explicație corespunzătoare acestui proces de transformare genetică, dar el are un merit deosebit deoarece l-a semnalat pentru prima dată, impulsionînd lumea științifică la elucidarea mecanismului său.

A doua treaptă în elucidarea mecanismului transformării este reprezentată de experiențele lui Alloway efectuate în 1932 și de experiențele lui Dawson și Sia din 1937. Aceștia au reușit să determine transformarea genetică prin cultivarea celulelor de tip „R“ în mediu lichid la care au fost adăugate extracte filtrate obținute din liza celulelor de tip „S“.

Deși nu au precizat natura agentului transformant acești autori au putut astfel exclude implicarea materialului capsular în procesul transformării. Trebuia căutată altă substanță cu proprietăți transformante.

A treia treaptă și cea decisivă în elucidarea naturii agentului transformant este reprezentată de experiențele americanilor O. T. Avery, C. M. MacLeod și M. MacCarty ale căror rezultate

sînt publicate în 1944 într-o lucrare devenită clasică. În această lucrare se arată că în urma cultivării celulelor de tip *R* în prezența ADN înalt purificat, extras de la celulele de tip *S* se poate obține o transformare efectivă a celulelor nevirulente *R* în celule virulente *S*. Descoperirea era suprinzătoare (Watson a numit-o „bomba“ lui Avery) pe fondul unei gîndiri dogmatice dominată de acceptarea generală a ideii că substanțele proteinice au rol de material ereditar, fapt ce a făcut ca la început chiar lui Avery să-i vină greu să creadă în propria sa descoperire epocală! Din această cauză rezultatele unei asemenea experiențe trebuiau verificate riguros prin efectuarea diferitelor teste. Astfel, testele serologice au eliminat posibilitatea contaminării extractului de ADN cu polizaharide. Testele proteolitice, în urma cărora extractul își păstra activitatea transformantă au eliminat posibilitatea ca proteinele să fie implicate în fenomenul transformării. În sfîrșit, testul de digestie cu dezoxiribonuclează (enzimă ce hidrolizează molecula polimerică de ADN) arată că extractul își pierde proprietatea transformantă. Era dovada peremptorie că agentul transformant este ADN. Prin aceasta s-a pus piatra de temelie la zidirea geneticii moleculare, știință prin care biologia secolului XX și a celor ce îl vor urma se va înscrie ca un domeniu revoluționar al științelor naturii. Descoperirea lui Avery și colaboratorilor săi declanșează o febrilă activitate în toate laboratoarele lumii. Se demonstrează rolul transformant al ADN și la alte bacterii apoi la plante și animale, fenomenul transformării devenind în cele din urmă o cale prin care este transformată dirijat ereditatea în cadrul ingineriei genetice.

O altă dovadă a rolului genetic al ADN a reprezentat-o descoperirea *conjugării bacteriene* de către Lederberg și Tatum în 1946. Acesta este un proces natural prin care ADN al unei bacterii este direct transferat unei alte bacterii. Bacteriile se deosebesc după tipul sexuat. Astfel sînt bacterii de tip sexuat mascul desemnate F^+ și de tip sexuat femel, desemnate F^- între ele fiind un transfer unidirecțional de material genetic de la F^+ la F^-.

Capacitatea de a transfera gene o au numai acele bacterii care posedă un factor ereditar numit *factor de fertilitate (F)*. Aceasta reprezintă tot o moleculă ADN, localizată în citoplasmă, adițională cromozomului bacterian principal. El se poate integra în cromozomul principal devenind ceea ce se numește un *episom*. În stare integrată factorul *F* conferă bacteriei capacitatea de a transfera cu o frecvență înaltă gene la tipul femel

și asemenea tulpini au fost desemnate *Hfr* căci transferînd genele cu o mare frecvență determină totodată o înaltă frecvență de recombinare a genelor în populația bacteriană considerată. Transferul de gene se face într-o manieră unică, secvențială și orientată, pe baza sa stabilindu-se ordinea genelor pe cromozomul bacterian (cartarea genică) și totodată s-a conchis că acesta are formă circulară. Conjugarea bacteriană explică rolul pe care îl are ADN în ereditate, statutul său de substanță ereditară.

În anul 1952, N. Zinder și J. Lederberg descoperă transferul de gene între diferite tulpini bacteriene mediat prin *transducție fagică*. *Bacteriofagii* sînt virusuri ale bacteriilor descoperite încă din 1917 de către d'Herelle și care se mai numesc simplu *fagi*. Fagii se multiplică în celulele bacteriene lizîndu-le *(ciclul litic)* sau își integrează ADN lor în cromozomul celulei bacteriene *(-ciclul lizogen)*. Ciclul litic și ciclul lizogen sînt reversibile. Integrat în cromozomul bacterian la ieșirea din acesta ADN fagic poate smulge gene bacteriene pe care să le transfere la o altă tulpină bacteriană (Fig. 1). În același an, A. Her-

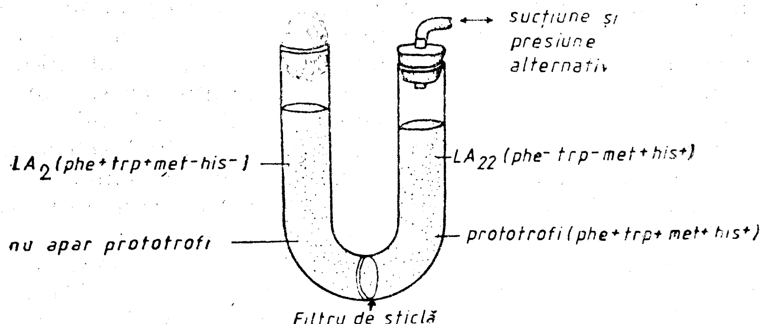


Fig. 1. Experiența de transducție efectuată de Zinder și Lederberg în 1952. Două tulpini auxotrofice de *Salmonella typhimurium*, *LA*22 și *LA*2 au fost plasate fiecare într-un braț separat al tubului Davis de forma literei U. Brațele sînt separate printr-un filtru de sticlă care nu permite schimbul de celule dar permite trecerea mediului lichid dintrun-un braț în celălalt, astfel că cele două tulpini sînt de fapt crescute pe un același mediu. Formele prototrofe apar numai în brațul care conține tulpina *LA*22 nu însă și în acela care conține tulpina *LA*2. Cu alte cuvinte un „agent filtrabil" (FA) activ genetic apare legat de tulpina *LA*2 care poate produce prothtrofi *La22.* S-a dovedit că agentul filtrabil este de fapt un fag temperat care a trecut odată cu mediul de cultură prin filtru de sticlă de tulpina *LA*2 la tulpina *LA*22 pe care o lizogenizează, transferîndu-i genele de tip sălbatic (poe+, trp+) de la tulpina nelizogenă *LA*2 și transformînd-o astfel într-o tulpină prototrofă. Acest fenomen de trecere a unor gene de la o tulpină bacteriană la alta imediat de fagi s-a numit transducție fagică. Fagul transductant a fost desemnat P_{22}.

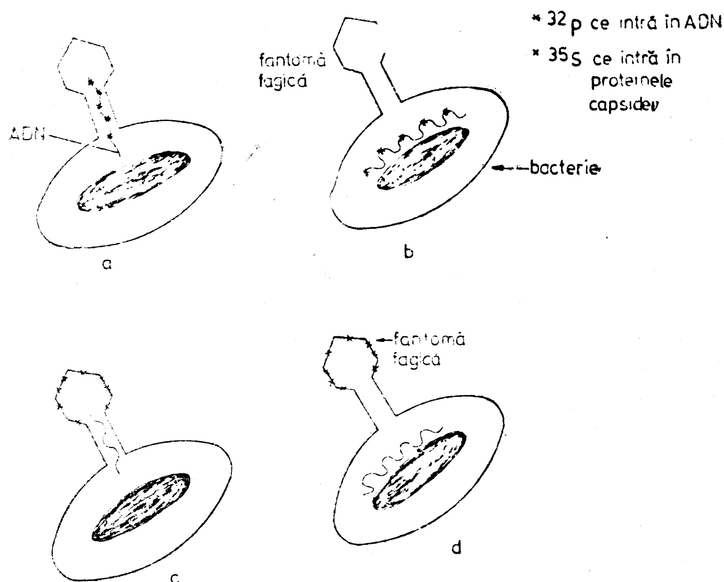


Fig. 2. **Demonstrarea rolului genetic al ADN prin studii autoradiografice efectuate de Hershey și Chase (1952). a.b. — radioactivitatea însoțește numai *ADN* și se decelează în interiorul celulei; c, d. — radioactivitatea însoțește numai proteinele și nu apare în interiorul celulei bacteriene gazdă.**

shey și Martha Chase demonstrează rolul în ereditate al ADN fagic, excluzînd totodată orice implicație directă a proteinelor în fenomenul ereditar (Fig. 2). Fagii pătrund în celula bacteriană unde se multiplică pe seama componentelor celulei gazdă și apoi, în urma lizei celulei bacteriene se eliberează noile particule fagice. Bacteriofagii au alcătuire foarte simplă. Ei prezintă o *capsidă* proteinică care înconjură un miez de ADN. Autorii au folosit bacteriofagi de tip T_2 care conțin cca 40% ADN și 60% proteine. Capsida proteinică, în interiorul căreia se află ADN formează capul bacteriofagului care se continuă cu o „coadă". Cu ajutorul cozii, bacteriofagul se atașează la peretele celular al celulei bacteriene, coada avînd la partea sa distală o placă hexagonală cu șase spini scurți și numeroase fibrile și posedă activitate lizozimică prin care peretele celulei bacteriene este dizolvat local. Pe această cale ADN fagic este injectat în interiorul celulei bacteriene, învelișul proteinic al fagului rămînînd la exterior sub formă de „fantomă" fagică. Prin experiențe

de marcare cu izotopi radioactivi, Hershey şi Chase au demonstrat care este funcţia ADN (Fig. 2). Componentele bacteriofagului au fost marcate pe rînd, proteinele capsidei cu ^{35}S şi ADN fagic cu ^{32}P. ^{35}S şi ^{32}P diferă în intensitatea energiei radiaţiilor β pe care le emit fiind uşor de distins. Cu asemenea bacteriofagi marcaţi au fost infectate culturile bacteriene. Prin centrifugare au fost îndepărtaţi bacteriofagii neataşaţi iar prin agitare puternică s-au putut separa „fantomele" fagice. Cînd s-au marcat proteinele cu ^{35}S s-a constatat că între 80 şi 97% din ^{35}S este asociat cu fracţiunea proteinică a „fantomelor" fagice. Cînd s-a marcat ADN cu ^{32}P s-a constatat că cea mai mare parte a radioactivităţii apare în interiorul celulei bacteriene. S-a tras concluzia că în timpul infecţiei fagice în celula gazdă nu pătrunde întreg bacteriofagul ci numai ADN-ul său. Acesta stă la baza multiplicării fagului cu apariţia de noi particule fagice identice cu cea iniţială. Deşi în celula gazdă pătrunde doar ADN, după 30 minute rezultă particule virale întregi care conţin atît acid nucleic cît şi proteine. Rezultă că ADN conţine toată informaţia ereditară, atît pentru propria sa sinteză cît şi pentru sinteza proteinelor virale.

Aceste două categorii de experienţe — de transformare şi de infecţie fagică au demonstrat faptul că *ADN*-ul *reprezintă materialul genetic, substratul chimic al eredităţii, atît la virusuri cît şi la sistemele biologice celulare.*

Dat fiind faptul că unele virusuri — *ribovirusurile* — prezintă ca miez de acid nucleic acidul ribonucleic (ARN) s-a pus în mod firesc problema cine îndeplineşte în acest caz rolul de material ereditar.

Experienţele lui Fraenkel-Conrat, Singer şi Williams pe de o parte şi ale lui Gierer şi Schramm pe de alta, desfăşurate între 1955—1956 au adus dovezi sigure după care la ribovirusuri ARN viral îndeplineşte rol de material ereditar (Fig. 3). Aceşti autori au lucrat cu virusul mozaicului tutunului (VMT) care are formă cilindrică în interior aflîndu-se ARN (6%) ce este înconjurat de proteină (94%) avînd o lungime de 300 μm şi o lăţime de 15 μm. Pe cale chimică proteina virală poate fi separată de ARN. Cele două componente pot fi astfel inoculate separat la plante de tutun. S-a constatat că proteina virală nu este capabilă de a determina infecţia virală pe cînd ARN viral are caracter infecţios.

Cînd Gierer şi Schramm au folosit ARN pur izolat de la VMT spre a infecta plante de tutun, au constatat că se produce

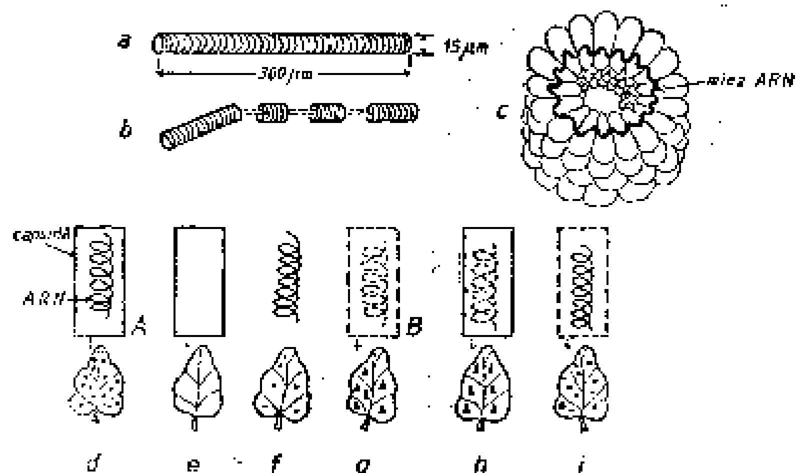


Fig. 3. Demonstrarea rolului genetic al ARN viral la VMT. a. forma particulei virale VMT și dimensiunile sale. b. prin hidroliza proteolitică se poate vizualiza electronomicroscopic miezul de acid nucleic ARN în trei puncte; c. aranjamentul ipotetic al asamblării VMT din capsomere și ARN viral; d—i — dovedirea rolului genetic al ARN viral. d — tulpina A de VMT produce pete rotunde pe frunzele de tutun; e. cînd se folosește în infectarea frunzelor doar proteina virală de la tulpina A nu are loc infecția; f. cînd se folosește în infecție ARN viral pur de la tulpina A se realizează infecția, rezultînd pete caracteristice tulpinei A; g. o altă tulpină B de VMT determină pete triunghiulare pe frunza de tutun; h, i. — disocierea proteinei virale de ARN viral permite formarea de particule virale hibride în care proteina aparține tulpinii A iar ARN la tulpina B și viceversa. Folosind în infecție asemenea himere (hibrizi) virali se realizează infecția, tipul de pată virotică fiind determinat de ARN participant la alcătuirea himerei și nu de proteină.

infecția caracteristică, identică cu aceea produsă de particule virale întregi. Din plantele infectate cu ARN viral pur s-au putut izola particule virale progene identice cu cele de la care s-au extras ARN și care erau formate din ARN și proteine.

Cînd în prealabil ARN viral a fost tratat 10 minute la 4°C cu RNază, enzimă care degradează în mod specific ARN, nu s-a mai obținut infecția caracteristică. A fost dovada cea mai sigură că ARN viral reprezintă la ribovirusuri materialul lor ereditar.

3. STRUCTURA ACIZILOR NUCLEICI

3.1. SCURT ISTORIC

Acizii nucleici sînt acizi organici care conțin fosfor, reprezentînd substanțe macromoleculare din grupa biopolimerilor.

Descifrarea structurii ADN a fost îndelung pregătită. În anul 1868, studentul elvețian de numai 24 de ani, F. Miescher descoperă în nucleii celulelor prelevate din puroi uman, ca de altfel și în lapții de somon și sperma altor animale o substanță cu un înalt conținut de fosfor pe care a numit-o *nucleină* și pe care, în 1872, o consideră a fi materialul genetic activ al spermatozoizilor. Mult timp această idee nu a fost îmbrățișată de lumea biologilor. Abia în 1939, Astbury și Caspersson, în cadrul celui de-al VII-lea Congres de Genetică, vor avansa ideea că acizii nucleici ar servi ca matriță pentru sinteza proteinelor, asigurînd reproducerea materiei vii.

În 1899, R. Altmann identifică în nucleina de drojdie o substanță macromoleculară pe care a numit-o acid nucleic. În anul 1909, P. Levene arată că acidul nucleic de drojdie conține patru baze azotate: *adenina, guanina, citozina* și *uracilul* precum și acid fosforic și o pentoză — *riboza.* În 1930, același autor analizează compoziția chimică a acidului nucleic din timus și constată că acesta conține *adenină, guanină, citozină* și *timină* ca baze azotate precum și *acid fosforic* și *dezoxiriboză.* La acea vreme, acidul care este nucleic de la drojdie a primit denumirea de *acid ribonucleic* (ARN) iar cel din timus de vițel a fost numit *acid timonucleic,* de fapt *acid dezoxiribonucleic* (ADN).

3.2. STRUCTURA PRIMARĂ A ADN

Unitățile structurale ale ADN, monomeri, se numesc *nucleotide.* De aceea acizii nucleici se numesc *polinucleotide,* adică polimeri de nucleotide. În anul 1952, Todd a stabilit legăturile chimice dintre componentele de bază ale macromoleculei ADN. Un nucleotid este alcătuit dintr-o bază azotată, o moleculă de *dezoxiriboză* și un rest fosforic. Bazele azotate sînt de tip organic, relativ hidrofobe. Ele sînt de două feluri: *purinice* — adenina (A) și guanina (G) și *pirimidinice* — citozina (C) și timina (T). Nucleul purinic este un dublu heterociclu al-

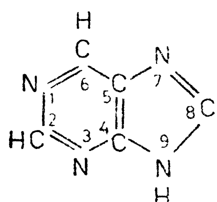


Fig. 4. Nucleu purinic.

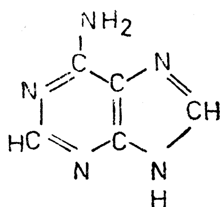


Fig. 5. Adenina.

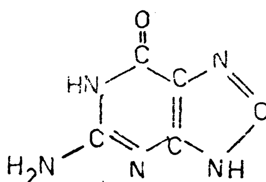


Fig. 6. Guanina.

cătuit din 4 atomi de azot (N) şi 5 atomi de carbon (C) (Fig. 4). Adenina este o 6-aminopurină (Fig. 5), pe cînd guanina este 2-amino, 6-oxipurina (Fig. 6).

Nucleul pirimidinic este un heterociclu aromatic alcătuit din 2 atomi de azot şi 4 atomi de carbon (Fig. 7). Timina este o 2,6-dioxi, 5-metilpirimidina (Fig. 8) iar citozina este o 2-oxi, 6-aminopirimidină (Fig. 9). Bazele azotate A, G, T, C, predomină în ADN de la marea majoritate a speciilor. În unele cazuri însă, bazele azotate obişnuite pot fi înlocuite de unii derivaţi ai lor (Fig. 10—13). Astfel, la grîu circa 1/4 din resturile citozină apar ca 5-metilcitozină, care are proprietăţi de împerechere asemănătoare citozinei. Acest derivat al citozinei apare şi la alte graminee, ca dealtfel şi la mamifere.

La fagii de *tip T* ai bacteriei *Escherichia coli (E. coli)* citozina este înlocuită complet cu 5-hidroximetilcitozina care de regulă este conjugată cu glucoza. De asemenea, la unele virusuri se află 5-hidroximetiluracilul, iar la unele bacterii se află 6-metilpurină.

Purinele şi pirimidinele conţin duble legături sau legături conjugate, din care cauză ele se pot prezenta sub forme chimice

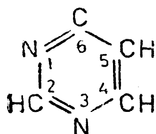


Fig. 7. Nucleu pirimidinic.

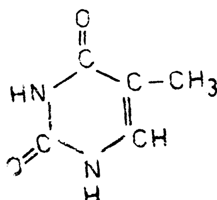


Fig. 8. Timina.

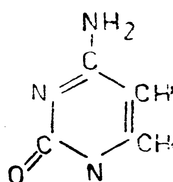
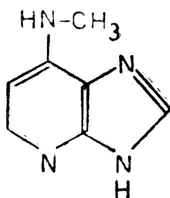
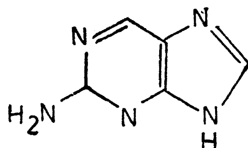


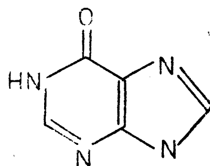
Fig. 9. Citozina.





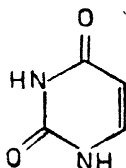
Analogi ai adeninei

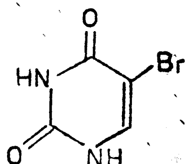
Fig. 10. Analogi ai **adeninei: 6-metilaminopurina și 2-aminopurina.**

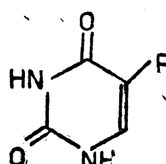


Analog al guaninei

Fig. 11. **Analog al guaninei; hipoxantina.**

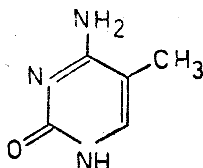


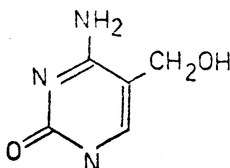


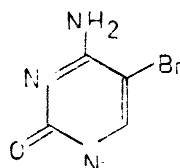


Analogi ai uracilului

Fig. 12. **Analogi ai uracilului. Uracilul; 5-bromouracil; 5-fluorouracil.**





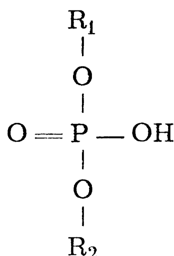


Analogi ai citozinei

Fig. 13. Analogi ai citozinei. **5-metilcitozină; 5-hidroximetilcitozină; 5-bromocitozină.**

diferite, cunoscute sub denumirea de structuri *tautomere*. Astfel, nucleele structurale ale macromoleculei ADN se caracterizează atît printr-o mare stabilitate structurală, cît şi prin posibilităţi de a se prezenta sub variante structurale. Asemenea aspecte contradictorii stau la baza dialecticii fenomenului ereditar.

Purinele şi pirimidinele pot realiza legături chimice cu pentozele. Atomii de carbon ai pentozelor sînt numerotaţi 1', 2', 3', 4' şi 5'. Carbonul 1' al pentozei se leagă cu atomul de azot din poziţia 1 al pirimidinei sau cu atomul de azot din poziţia 9 al purinei. Prin intermediul restului fosforic se realizează legături între carbonul 5' al dezoxiribozei unui nucleotid şi carbonul 3' al dezoxiribozei nucleotidului următor, formîndu-se serii lungi de asemenea legături 5'—3' sau 3'—5' în cadrul polimerului care stau la baza structurii primare a macromoleculei ADN reprezentată de o catenă polinucleotidică de lungime variabilă, specifică fiecărei specii. Legăturile 5'—3' sau 3'—5' reprezintă legături internucleotidice fosfo-diesterice covalente, realizate între acidul fosforic şi grupările hidroxilice (oxidrilice) ale glucidului din poziţiile 3' şi 5', avînd loc esterificarea a două grupări hidroxilice ale restului fosforic:



Legăturile fosfodiesterice sînt foarte puternice şi deci stabile, pe seama lor realizîndu-se o structură liniară, reprezentînd o adevărată coloană vertebrală a monocatenei ADN. În structura macromoleculei ADN intră patru tipuri principale de nucleotide: dezoxiadenozintrifosfat (*d*ATP), dezoxitimidintrifosfat (*d*TTP), dezoxiguanozintrifosfat (*d*GTP) şi dezoxicitidintrifosfat (*d*CTP). Cînd se asamblează în monocatena polinucleotidică aceste nucleotide rămîn sub formă de dezoxinucleotid-5'-monofosfat.

Nucleotidul prezintă o regiune specifică, reprezentată de baza azotată şi o regiune nespecifică reprezentată de dezoxiri-

boză și restul fosforic. În cadrul macromoleculei, punțile fosfodiesterice se stabilesc întotdeauna între aceleași grupări care sînt grupări nespecifice, ceea ce conferă acestei părți a macromoleculei o mare regularitate, respectiv uniformitate, ce caracterizează toate moleculele de ADN, de orice proveniență ar fi. Nu același lucru se poate spune despre bazele azotate, care reprezintă regiunea specifică a nucleotidelor, a căror înșiruire de-a lungul catenei polinucleotidice variază de la o moleculă de ADN la alta, adică de la o specie la alta și această orînduire, secvență de baze azotate, specifică fiecărei specii, reprezintă modul în care este înscrisă, (sub formă codificată biochimic) în macromolecula ADN informația genetică ce dirijează realizarea diferitelor caractere ereditare.

3.3. STRUCTURA SECUNDARĂ A ADN

Pentru descifrarea structurii secundare a ADN au fost folosite metode precum spectrofotometria, rezonanța magnetică nucleară, absorbția în ultraviolet, cromatografia în raze X etc. Difracția în raze X a dat cele mai bune rezultate în descifrarea structurii secundare a ADN.

Primele cercetări privind descifrarea structurii ADN prin analiza imaginilor difracției în raze X au fost întreprinse de către Astbury în anul 1938. În același an Astbury și Bell au arătat că macromolecula de ADN are o structură fibrilară, iar pe axa sa lungă bazele azotate stau perpendicular, între două baze azotate vecine fiind o distanță de 3,4 Å. Cele mai bune imagini ale difracției în raze X sînt însă obținute în perioada 1950—1952 de către M. H.F. Wilkins și Rosalind Franklin. Principiul difracției în raze X este următorul: un fascicul de raze X trece printr-o substanță și cade apoi pe o placă fotografică. Dacă substanța prezintă un aranjament neregulat al unităților sale structurale razele X vor produce pe placa fotografică o pată centrală reprezentînd poziția fascicului principal. Dacă subunitățile substanței prezintă un aranjament ordonat, razele X vor fi deviate în anumite direcții mai mult decît în altele. Dacă aranjamentul subunităților prezintă un model ce se repetă regulat, pe placa fotografică vor apare benzi foarte distincte între care există spații foarte clare. S-a constatat că ADN care provine de la surse foarte diferite produce prin difracție în raze X un model de benzi foarte clar și aproape identic

ceea ce denotă aranjamentul ordonat al monomerilor în cadrul macromoleculei ADN. Mai mult, modelul de difracție în raze X a sugerat că macromolecula ADN are o structură helicoidală (Fig. 14).

De o deosebită importanță în elucidarea structurii secundare a ADN s-au dovedit a fi cercetările lui Chargaff din 1950, prin care s-a stabilit, contrar părerilor comune dominate de con-

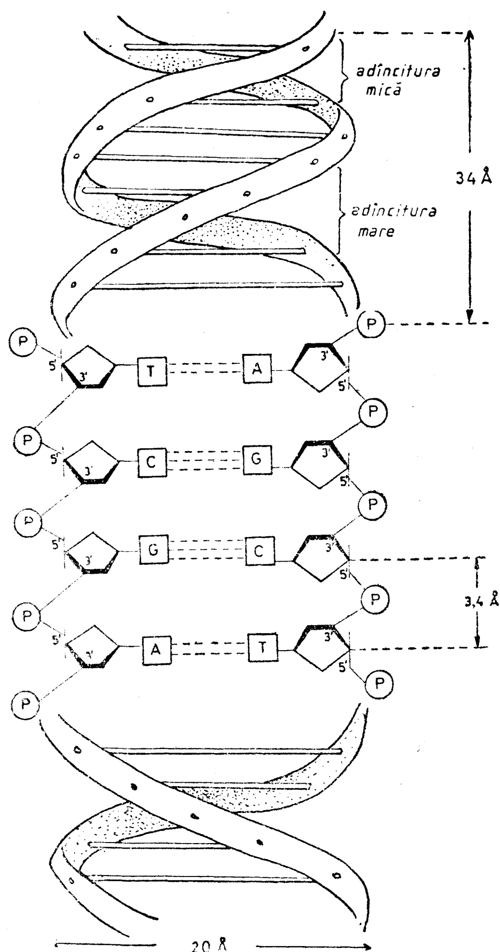


Fig. 14. Structura secunsară a ADN și constantele fizice ale macromoleculei.

cepția tetranucleotidului lui Levene (macromoleculă ADN/la toate speciile rezultă printr-o repetare uniformă a celor patru nucleotide), că cele patru baze azotate principale care intră în structura ADN nu sînt prezente în proporții egale la diferitele specii. Mai mult, el a stabilit regula echivalenței după care totdeauna cantitatea de adenină (A) este egală cu aceea a timinei (T) iar cantitatea de guanină (G) este egală cu aceea a citozinei (C) de unde rezultă un raport T/A = C/G = 1 la organisme foarte diferite precum *Mycobacterium tuberculosis avium, Saccharomyces cerevisiae, Bos taurus* sau *Homo sapiens.* Aceste constatări cunoscute și sub denumirea de legile lui Chargaff au reprezentat un punct de sprijin de mare importanță pentru elaborarea ideii împerecherilor de baze, piatră de temelie a modelului propus de Watson și Crick în 1953 pentru structura secundară a ADN.

Pe de altă parte studiile de hidroliză urmată de separarea cromatografică a bazelor azotate și estimarea lor cantitativă în spectrofotometrie în ultraviolet, efectuate de către Chargaff și colaboratorii în 1949, au arătat că ADN de la cele patru specii menționate anterior are o compoziție în baze azotate foarte diferită, raportul A + T/G + C fiind foarte variabil la aceste organisme, independent de țesutul sau de individul de la care este extras ADN

Tabelul 1

Compoziția în baze a ADN

Specia	Proporția în %			
	A	T	G	C
Om (spermă)	31,0	31,5	19,1	18,4
Somn (lapți)	29,7	29,1	20,8	20,4
Arici de mare	32,8	32,1	17,7	17,7
Drojdie	31,7	32,6	18,8	17,4
Mycobacterium tuberculosis	15,1	14,6	34,9	35,4
Escherichia coli	26,1	23,9	24,9	25,1
Virusul Vaccinia	29,5	29,9	20,6	20,3
Bacteriofagul T_2 de E. coli	32,6	32,6	18,2	16,6*

* 5-hidroximetilcitozină

Apar variații mari în raportul A+T/G+C la diferite organisme (tabelul nr. 1). La plantele și animalele superioare apare un exces de A + T față de G + C. Variațiile acestui raport nu sînt întîmplătoare. Raportul A + T/G + C este specific fiecărei

specii, fiind mult mai apropiat la organismele înrudite filogenetic.

Sintetizînd în mod magistral datele acumulate în literatura de specialitate, bazaţi şi pe experienţele proprii incluzînd modelarea moleculară, în anul 1953, Watson şi Crick au propus modelul de structură bicatenară a ADN (Fig. 14). unanim acceptat, reprezentînd una dintre cele mai mari descoperiri din istoria ştiinţei, pentru care autorii au primit premiul Nobel. Modelul propus de Watson şi Crick se deosebea radical de modelul tricatenar propus de Linus Pauling şi Corey în care bazele erau dispuse la exterior şi în care nu existau forţe care să asigure stabilitatea structurii triplu catenare, iar unele distanţe *van der Waals* erau prea mici (Watson şi Crick, 1953). De asemenea Watson şi Crick au adus argumente şi împotriva modelului tot tricatenar propus de Fraser, înaintat spre publicare chiar în perioada în care apărea lucrarea lor. Ei au propus modelul de structură bicatenară, în care fiecare catenă helicală se răsuceşte în jurul aceleiaşi axe virtuale şi constă din grupe fosfodiesterice care unesc resturile β-D-dezoxiribofuranozice cu legături 3′, 5′. Ambele catene sînt orientate dextral, dar secvenţele atomilor în cele două catene sînt orientate în direcţii opuse. Bazele se află spre interiorul helixului iar grupele fosfat în afară. Zahărul este perpendicular pe bază. Structura prezintă repetiţii (pasul elicei) după fiecare 10 resturi pe fiecare catenă, adică după 34 Å, existînd cîte un rest (bază) pe fiecare catenă la fiecare 3,4 Å. Distanţa atomului de fosfor faţă de axa fibrei este de 10 Å. Fiind dispuse la exterior, grupările fosfat sînt uşor accesibile cationilor. Aceasta este o structură deschisă şi conţinutul său de apă este mare. Planurile bazelor sînt perpendiculare pe axa fibrei. Ele sînt unite prin punţi de hidrogen, formînd perechi specifice de baze căci totdeauna are loc unirea unei baze purinice cu una pirimidinică şi viceversa.

Astfel, ADN se prezintă ca o substanţă macromoleculară bicatenară, adică alcătuită din două lanţuri polimerice (catene) răsucite plectonemicul unul în jurul celuilalt după un ax virtual, rezultînd structură bicatenară helicoidală numită ***dublu helix ADN.***

Diametrul dublului helix este de 20 Å avînd un pas (spiră) de 34 Å. Fiecare spiră a dublului helix ADN cuprinde cîte 10 nucleotide, ceea ce înseamnă că dimensiunea fiecărei baze este de 3,4 Å.

Cele două lanţuri polinucleotidice sînt antiparalele, adică la unul legăturile fosfodiesterice se realizează între C 3′ al dezoxi-

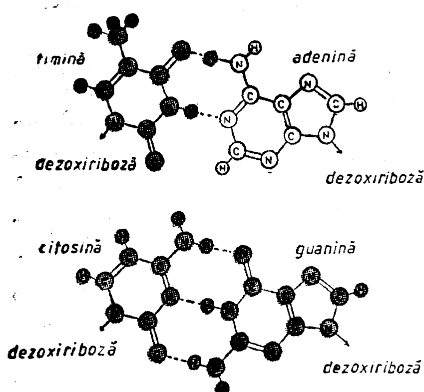


Fig. 15. Perechile specifice de bază A=T și *G* = C care stau la baza structurii bicatenare a ADN.

ribozei unui nucleotid și C 5′ al dezoxiribozei nucleotidului vecin, pe cînd la nivelul celuilalt lanț polinucleotidic legăturile fosfodiesterice se realizează în sens invers C 5′ ⟶ C 3′. Raportul A/T = G/C = 1 a sugerat realizarea unor împerecheri, dovedite a fi reale și prin modelare moleculară, între A și T respectiv G și C. Împerecherea de baze azotate are la bază principiul complementarității, cel mai de seamă în organizarea și funcționarea materialului ereditar. Astfel, A se dovedește a fi complementară lui T iar G lui C, adică bazele purinice prezintă complementaritate chimico-spațială pentru cele primidinice, iar bazele primidinice prezintă complementaritate pentru cele purinice (Fig. 15). Asemenea perechi de baze prezintă dimensiuni egale conferind macromoleculei. ADN un diametru uniform pe toată lungimea sa. O împerechere purină-purină sau pirimidină-pirimidină ar depăși sau ar fi mai mică față de diametrul de 20Å cît are în mod normal dublul helix ADN lipsindu-l de regularitate. Împerecherile de baze se realizează prin intermediul unor punți de hidrogen, două între A și T și trei între G și C. Împerecherile sînt reciproce: A—T, T—A respectiv G—C, C—G.

Dar legăturile de hidrogen joacă un rol foarte important în reacțiile biomoleculelor, formîndu-se și dezorganizîndu-se cu ușurință fără a necesita surse energetice speciale, avînd totodată rol esențial în reacțiile care implică recunoașterea de structuri complementare cum ar fi replicarea, transcrierea și repararea ADN ca și în traducerea mesajului genetic.

Structura bicatenară a ADN prezintă de regulă o mare stabilitate fizică, asigurată pe verticală de punțile fosfodiesterice intracatenare, iar pe orizontală de punțile de hidrogen intercatenare și de stivuirea *(stacking)* perechilor de baze azotate în cadrul dublului helix, toate acestea făcînd ca ADN dublu-catenar să apară ca o structură oarecum rigidă, para-

cristalină. Caracteristicile structurale finale ale ADN dublu-catenar sînt dictate însă de moleculele de dezoxiriboză care se aşază cu oxigenul inelului orientat în sus în cadrul unei catene şi orientat în jos în cadrul catenei complementare. Din cauza acestui aranjament opus al moleculelor de dezoxiriboză în cele două catene şi deoarece zahărul se leagă la o poziţie excentrică a bazei azotate, întreaga moleculă de ADN este obligată să se răsucească, să se spiralizeze, rezultînd nu o structură dreaptă bicatenară ci una spiralată — *dublul helix,* în care fiecare pereche succesivă de baze azotate se întoarce cu 36° în direcţia acelor de ceasornic, dublul helix făcînd un tur complet (360°) la fiecare 10 perechi de baze.

Structura polimerică a macromoleculei ADN permite înscrierea în aceasta, sub formă codificată, a unei cantităţi de informaţie genetică teoretic nelimitată. Numărul permutărilor posibile este de 4^n, în care n reprezintă numărul nucleotidelor de-a lungul unei catene ADN. Cunoscînd că cele mai mici virusuri au în ADN cel puţin 1500—3000 nucleotide, aceasta fiind limita inferioară dimensională a genomului pentru sistemele biologice, putem avea imaginea enormei diversităţi informaţionale a sistemelor ereditare din lumea vie, şi ne putem explica de ce este posibil ca fiecare specie să aibă propria sa informaţie ereditară, diferită de a altor specii.

Recent două echipe de cercetători, una americană condusă de A. Rich de la Massachusetts Institute of Technology, şi alta olandeză (J. H. van Boom şi Gijs van der Marel) de la Universitatea din Leyda au descris la nivelul unor polinucleotide sintetice de tip poli d (G—C) duplexuri ADN cu spirala orientată *senestru* (ADN de stînga) avînd conformaţie diferită de ADN normal cunoscut ca ADN de dreapta. ADN de stînga prezintă aceeaşi regularitate internă, aceleaşi asocieri de baze azotate ca şi ADN de dreapta, dar şi unele diferenţe structurale considerabile. Astfel, în ADN de stînga grupele fosfat se dispun, nu după un traiect rectiliniu, ci după un traiect în zig-zag, ADN de stînga numindu-se şi *ADN-Z.* În ADN de stînga perechile de baze sînt expuse mai spre exteriorul dublului helix şi pasul elicei cuprinde, nu 10, ci doar 6 perechi de baze, din care cauză forţele de stivuire sînt mai mici iar molecula de *ADN-Z* apare mai fragilă, avînd un diametru ceva mai mic.

Plasarea perechilor de baze azotate mai spre exteriorul macromoleculei *ADN-Z* face ca substanţele reactante să interacţioneze mai uşor cu bazele azotate. Dacă aceste substanţe sînt can-

cerigene, *ADN-Z* poate să condiționeze transformarea malignă a celulei. Structură de tip *ADN-Z* poate să apară în anumite condiții chiar în cadrul structurii normale de ADN nativ la nivelul unor anumite segmente ale acestuia.

Conformații senestre au fost descrise la numeroase polinucleotide sintetice de tip *poli-d* (GC), *poli-d* (GC) sau *poli-d* (AC). *poli-d* (GT). Se arată că structura senestră este accesibilă oricărui segment de ADN cu o secvență de baze alternative purină-pirimidină (Arnott și colab., 1980). Descoperirea conformației senestre a ADN extinde enorm limitele structurilor secundare cunoscute pentru duplexurile ADN. Ele pot fi implicate în multe aspecte referitoare la schimbările conformaționale ale duplexului ADN în replicare, denaturare, transcriere. Regiunile dextre și senestre dintr-o moleculă de ADN pot fi separate doar de 2 nucleotide.

Pe baza datelor de structură a ADN se poate deduce funcția sa de moleculă informațională și se poate defini unitatea funcțională de transmitere a caracterelor ereditare care a fost numită *genă. Gena reprezintă un segment, o porțiune din macromolecula de ADN la toate sistemele biologice sau de ARN (la ribovirusuri) de lungime variabilă care deține sub formă codificată informația ereditară ce dirijează sinteza unei catene polipeptidice.* Gena conține în medie între 900 și 1500 perechi de nucleotide. Peste anumite limite de temperatură (între 63°C și 100°C) stabilitatea legăturilor de hidrogen cedează avînd loc desfacerea dublului helix.

În cele două catene complementare, fenomen numit denaturare termică. Cea mai scăzută temperatură de denaturare cunoscută este 65°C și se înregistrează în cazul denaturării polinucleotidului sintetic poli d (A—T). Dacă amestecul monocatenelor rezultate din denaturarea dublului helix de ADN se răcește brusc ele rămînd permanent separate și un asemenea ADN se numește *ADN denaturat.* Dacă amestecul de monocatene se răcește lent, treptat, are loc o reasociere a catenelor cu refacerea legăturilor de hidrogen dintre ele, restabilindu-se structura bicatenară a ADN. Acest fenomen s-a numit *renaturarea ADN* (Fig. 16).

Temperatură de denaturare poate constitui un indiciu indirect privind procentul de baze azotate din structura ADN. Un ADN în care predomină perechile A—T, între care există 2 punți de hidrogen, va prezenta o temperatură de denaturare mai mică decît un ADN în care predomină perechile G—C care, prezentînd trei punți de hidrogen, sînt mai rezistente la dena-

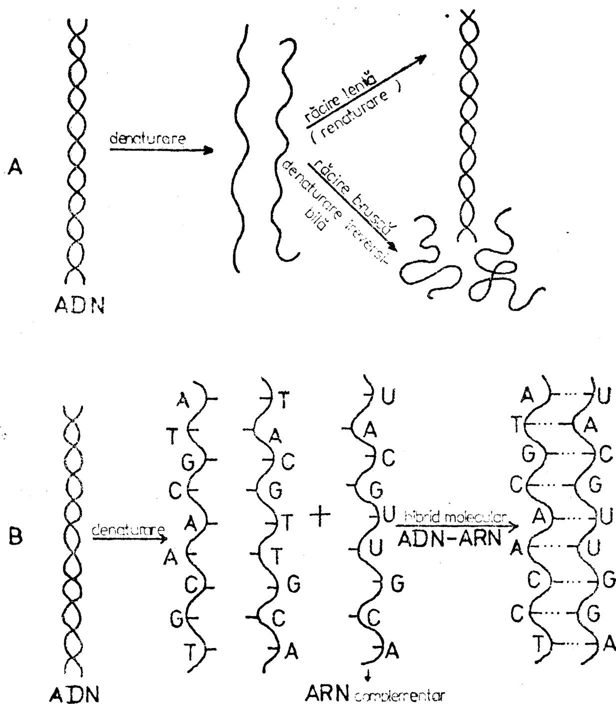


Fig. 16. Denaturarea şi renaturarea ADN (*A*). Denaturarea şi hibridarea moleculară (B).

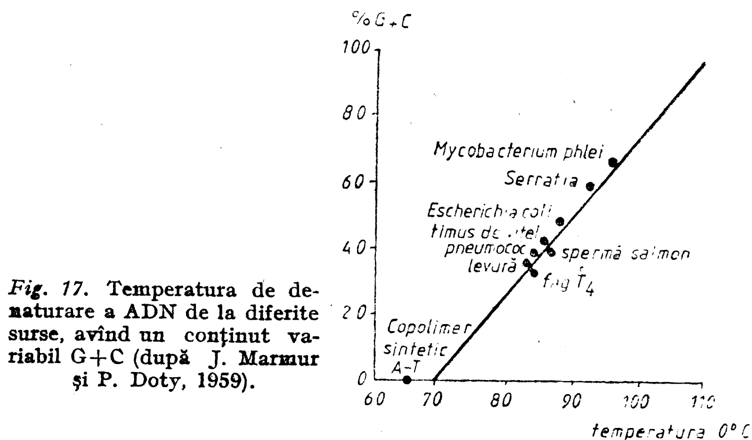


Fig. 17. Temperatura de denaturare a ADN de la diferite surse, avînd un conţinut variabil G+C (după J. Marmur şi P. Doty, 1959).

turare, necesitînd pentru aceasta o temperatură mai ridicată (Fig. 17).

Prin denaturare-renaturare se pot realiza hibrizi moleculari între ADN ce provine de la diferite specii, putîndu-se aprecia gradul de înrudire dintre specii pe criterii moleculare. Astfel, dacă renaturarea ADN homolog este teoretic de 100%, renaturarea ADN heterolog (ce provine de la specii diferite) este în funcție de apropierea filogenetică a speciilor (75% între om și maimuță și 25% între om și șoarece, bunăoară).

Hibrizi moleculari pot fi realizați și între ADN și ARN, iar cînd această hibridare se realizează *in situ* se pot localiza pe cromozomi genele care dirijează sinteza diferitelor categorii de ARN celular.

3.4. STRUCTURI TAUTOMERE

Prin deplasarea unor atomi de hidrogen de la un atom de azot sau oxigen de la o grupare la alta a nucleului purinic sau pirimidinic, fenomen numit mișcare tautomeră apar formele tautomere ale inelului purinic sau pirimidinic care trec de la

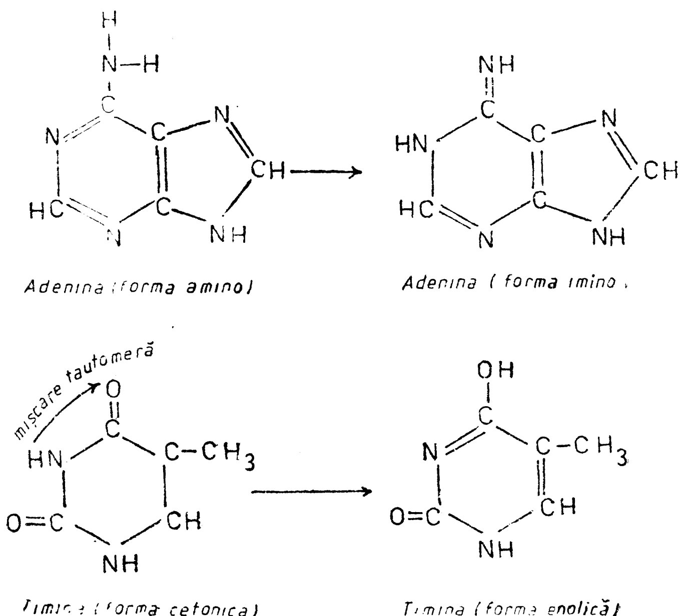


Fig. 18 **Structuri tautomere.**

forma *amino* (NH_2) la forma *imino* (*NH*). Același lucru se întîmplă cu atomii de oxigen legați de atomii C_6 ai guaninei și timinei care au în mod normal forma *ceto* (C=O) și care în urma mișcării tautomere trec în forma *enolică* (C—OH) (Fig. 18, 19).

Mișcarea tautomeră creează posibilitatea împerecherii greșite de baze azotate de tip A—C și G—T, fenomen care poartă în sine cauzele apariției de mutații spontane (vezi procesul mutagen).

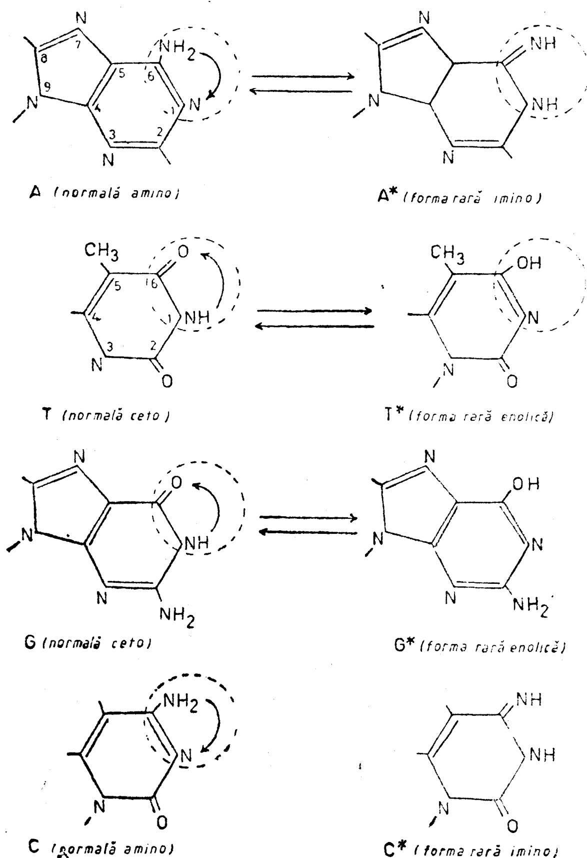


Fig. 19. **Tranzițiile tautomerice de la formele comune, stabile ale bazelor azotate (A, T, G, C) la formele rare, tautometice (A*, T*, G*, C*).**

3.5. EXCEPŢIE DE LA STRUCTURA BICATENARĂ A ADN

Cercetările lui Sinsheimer (1959) efectuate la bacteriofagul φ X174 au arătat că ADN la acest virus prezintă o structură care nu se încadrează în modelul de structură bicatenară. El nu prezintă o structură complementară, fiind atacat de către *fosfodiesteraza* extrasă din *E. coli*, acţiunea acestei enzime fiind ineficace pe structurile bicatenare de ADN. S-a tras concluzia că ADN de φ X174 este monocatenar, adică se prezintă în mod normal ca structură primară, apărînd ca o moleculă circulară de ADN monocatenar (Fig. 20). O situaţie asemănătoare s-a evidenţiat şi la alţi bacteriofagi precum φR şi S_{13}. Asemenea cazuri în care ADN se prezintă în stare naturală ca structură monocatenară ne sugerează că de fapt la toate sistemele biologice ar fi posibilă înscrierea informaţiei ereditare în structuri monocatenare. Starea dublucatenară nativă a ADN la covîrşitoarea majoritate a sistemelor biologice este o stare redutantă, reiterată. Dar cum înseşi structurile monocatenare devin în timpul replicării structuri dublu-catenare, înseamnă că natura a avut o anumită „raţiune" de a-şi baza realizarea fenomenului ereditar pe structuri dublu-catenare. Dealtfel natura face un foarte interesant joc de duplicitate, începînd de la perechea de baze azotate specifice, structurile dublu-catenare, structurile cromozomale bicromatidice, existenţa structurilor semicromati-

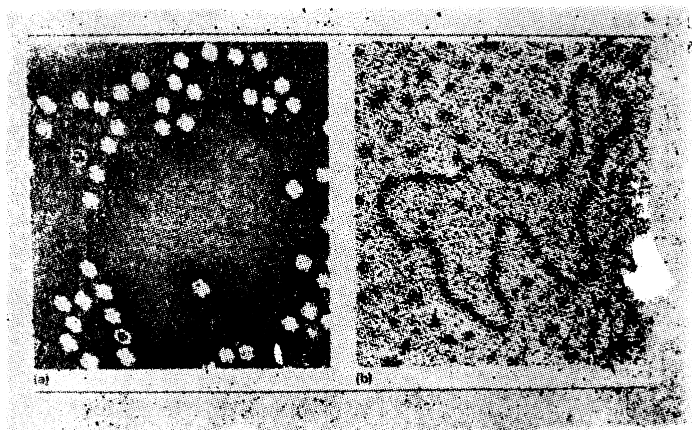


Fig. 20. Bacteriofagul ØX 174. a. particule fagice intacte colorate cu acetat de uranil; b. cromozomal circular (ADN) monocatenar de ØX 174 (după Finch, Dressler şi Wolfson, din Goodenough şi Levine, 1974).

dice și continuînd cu existența a două seturi de cromozomi în garnitura diploidă (numărul de cromozomi variază de la 1 la precariote la cel puțin 2 (*Ascaris megalocephala univalens*) sau 4 (*Haplopappus gracilis* — compozită) și ajungînd la ordinul a 8, 10, 20, 100 și mai mulți la alte eucariote (Lima-de-Faria însă, consideră că orice celulă eucariotă are de fapt nevoie doar de 3 cromozomi: un autozom pe care să fie plasate majoritatea genelor, un cromozom de sex care să intervină în determinarea sexului și un cromozom organizator nuclear care să posede, genele nucleolare) apoi două sexe separate, implicînd două tipuri de gameți diametral opuse și terminînd cu larg răspînditele cazuri de simetrii ale naturii (să luăm doar ființa umană, doi ochi, două urechi, două nări, două mîini, două picioare... etc...). Complementaritatea apare ca o condiție esențială în desfășurarea multor fenomene ale naturii. În cazul ADN, complementaritatea catenelor din structura dublu-catenară este esențială în procesele de replicare și transcriere, iar existența a două catene apare ca o „grijă“ a naturii de a asigura transmiterea fidelă a informației ereditare în condițiile în care fenomenul mutagen ar afecta una dintre cele două catene. Dacă mutația afectează o structură monocatenară șansa de a transmite fidel informația ereditară este practic nulă, pe cînd în cazul structurii dublu-catenare această șansă este de 50%. Dealtfel, vom vedea că în cazul reparării leziunilor din ADN induse de mutageni, integritatea uneia dintre cele două catene ale dublului helix ADN devine esențială, condiție sine qua non a reușitei reparării. Este de la sine înțeles că această „grijă“ a ADN, spre a-și asigura îndeplinirea funcției sale, nu are nimic de-a face cu aspecte de teleologie.

3.6. CANTITATEA DE ADN ȘI INFORMAȚIA EREDITARĂ

Cantitatea relativă de ADN poate fi apreciată citofotometric prin analiza nucleilor interfazici colorați cu leucofuxină (metoda Feulgen-Rossenbeck). Cantitatea de ADN este specifică fiecărei specii, ea menținîndu-se constantă de la o generație celulară la alta. În ciclul celular (perioada dintre două diviziuni succesive alcătuită din interfază și mitoză) se remarcă o trecere a cantității de ADN de la o valoare considerată diploidă tipică pentru fiecare specie (2 C) și care se înregistrează la sfîrșitul diviziunii nucleare, cînd nucleii fii trec în interfază, la dubla-

rea acestei cantități de ADN (4 C) în timpul interfazei. La următoarea diviziune nucleară prin intervenția aparatului mitotic cantitatea dublă (4 C) de ADN va fi distribuită echilibrat în celulele fiice, acestea primind o aceeași cantitate diploidă (2 C) de ADN.

Mitoza apare astfel ca un mecanism biologic fundamental care asigură constanța cantitativă a ADN-ului în succesiunea generațiilor celulare. Mitoza apare astfel ca o permanentă legătură între trecut și prezent, asigurînd transmiterea unei aceleiași cantități de informație genetică de la celula mamă la celulele fiice (Gavrilă și Dăbală, 1975).

S-a mai constatat că în gameți (celule sexuale) cantitatea de ADN este redusă la jumătate față de cantitatea diploidă caracteristică speciei considerate (2 C). Din această cauză, gameții sînt haploizi (cantitatea de ADN=1C). Totodată s-a constatat că în gameți numărul de cromozomi este redus la jumătate față de celulele somatice (toate celelalte celule ale organismului. Prin unirea gameților de sex opus, în procesul fecundării, se restabilește cantitatea normală de ADN caracteristică speciei date (1C+1C=2C). Gameții apar în urma unei diviziuni celulare de tip special numită *meioză*, aceasta fiind de fapt o diviziune de reducere (înjumătățire) a numărului de cromozomi și totodată a cantității de ADN. Meioza apare ca un mecanism compensatoriu al fecundării, obligatoriu la organismele cu reproducere sexuată care previne mărirea exponențială a cantității de ADN, ce ar avea loc în condițiile unei fecundări a gameților a căror cantitate de ADN nu ar fi redusă la jumătate comparativ cu celulele somatice.

ADN-ul se caracterizează printr-o remarcabilă constanță cantitativă riguroasă de-a lungul generațiilor celulare, ceea ce nu este cazul altor componente macromoleculare ale celulei (proteine, acizi ribonucleici etc.) care prezintă variații cantitative evidente nu numai de-a lungul generațiilor celulare dar chiar în cadrul diferitelor celule ale aceluiași organism la un moment dat. Recent, s-au adus multe date în sprijinul unor excepții de la regula constanței valorii cantitative a ADN, în ciclul celular, realizîndu-se variații ale cantității de ADN prin mecanisme de replicare diferențiată a ADN (Nagl, 1978, 1979).

Prin experiențe de marcare cu izotopi radioactivi (H^3, C^{14}, P^{32}) s-a constatat că radioactivitatea odată încorporată în macromolecula de ADN (de exemplu timidina tritiată — timidina H^3 — este încorporată în ADN în locul timinei fiind un precursor al acesteia) nu o mai părăsește atîta timp cît celula tră-

iește, ceea ce înseamnă că, odată sintetizată, macromolecula de ADN nu mai este dezagregată spre a fi resintetizată. Aceasta înseamnă că spre deosebire de alte componente macromoleculare care suferă turnover rapid (degradare și resinteză cu schimb continuu de atomi) macromolecula de ADN se caracterizează printr-o mare stabilitate.

Urmărind cinetica renaturării ADN-ului denaturat care aparține la specii diferite se constată că cu cît speciile sînt mai apropiate filogenetic cu atît procentul de refacere de structuri dublu-catenare este mai mare, aceasta deoarece speciile apropiate din punct de vedere filogenetic prezintă într-o proporție mai mare succesiuni similare de baze azotate în macromolecula lor de ADN, adică prezintă un anumit fond de informație ereditară comună. Acest fapt ne face să gîndim că evoluția speciilor s-a desfășurat în principal la nivel molecular.

3.7. SINTEZA REPLICATIVĂ A ADN

Deoarece ADN conține informația genetică a celulei, sinteza sa este unul dintre cele mai importante evenimente din viața acesteia.

Realizată prin intervenția unui complex aparat enzimatic, sinteza ADN este o reacție de tip replicativ, fiind unicul caz din lumea biomoleculelor în care o substanță își dirijează propria sa sinteză. Complexul de replicare care include aparatul enzimatic și molecula de ADN în replicare se numește *replisom*.

Structura bicantenară se dovedește a avea implicații biologice dintre cele mai profunde, dar prezintă și un foarte interesant punct de dezbatere filozofică ea explicînd, cel puțin în parte, unele dintre misterele vieții.

In vivo, sinteza acizilor nucleici (ADN și ARN) se desfășoară în trei etape:

a) sinteza precursorilor nucleotidelor purinice și pirimidinice adică a acidului uridilic și a acidului inozinic (Fig. 21);

b) sinteza nucleotidelor propriu-zise care intră direct în alcătuirea macromoleculelor acizilor nucleici (dezoxiadenozintrifosfat (*d*ATP), dezoxiguanozintrifosfat (*d*GTP), dezoxicitidintrifosfat (*d*CTP) și dezoxitimidintrifosfat (*d*TTP) pentru ADN; adenozintrifosfat (ATP), guanizintrifosfat (GTP), citidintrifosfat (CTP) și uridintrifosfat (UTP) pentru ARN;

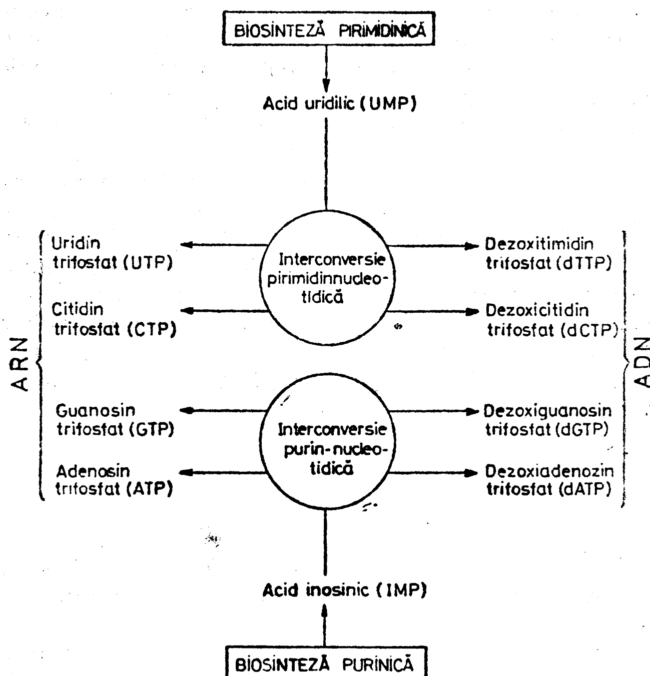


Fig. 21. Căile biosintezei nucleotidelor.

c) polimerizarea ordonată a nucleotidelor într-o secvență complementară unei matrițe (după modelul semiconservativ) sub cataliza unor enzime polimerazice celulare.

Sinteza *in vitro* a ADN a fost realizată de către A. Kornberg, I. Lehmann, M. J. Bessman și E. S. Simms în 1956, în sisteme acelulare folosind un echipament enzimatic polimerazic extras de la *E. coli (ADN polimeraza I* sau *enzima lui Kornberg)* în prezența ionilor Mg^{++} și a unei matrițe ADN înalt-polimerizată.

Sinteza *in vitro* a ARN a fost realizată pentru prima dată de către Marianne Grunberg-Manago și Severo Ochoa de la Universitatea din New York, în anul 1955. Pentru aceasta au folosit un sistem enzimatic ARN polimerazic, ionii metalici bivalenți (Mg^{++}) și un segment ADN ca matriță.

Mecanismul de replicare *semiconservativă* a ADN presupune separarea catenelor complementare prin desfacerea punților de

hidrogen, fiecare catenă servind drept matriță pentru sinteza unui noi catene complementare, refăcîndu-se astfel structura bicatenară a noilor macromolecule ADN care vor avea astfel cîte o catenă veche și alta nou sintetizată. Acesta este modelul *semiconservativ de replicare* a ADN. Prima dovadă experimentală în sprijinul modelului semiconservativ de replicare a ADN este adusă la nivel cromozomal de către H. Taylor (1957, 1958) în sistemele eucariote și în același timp, la nivel molecular, de către meselson și Stahl (1958) în sistemele procariote *(E. coli)*.

Încă din anul 1950 Swift arătase că replicarea ADN în celulele eucariote este restrînsă doar la interfază la un stadiu pe care Howard și Pelc l-au numit stadiu „S", separat de diviziunea precedentă printr-un stadiu G_1 (de gol sintetic) și urmat de un stadiu G_2 în care, de asemenea nu se mai sintetizează ADN. G_1 este foarte variabil durînd de la 3—4 ore, la zile, săptămîni și luni, depinzînd de tipul de celulă și starea fiziologică (Gavrilă și Dăbală, 1975). G_2 este mult mai constant, durînd 2—5 ore iar S durează 7—8 ore. Pregătirea nucleului pentru replicarea ADN se face în G_1, fapt demonstrat de expunerea, prin transplant a nucleilor, la citoplasma celulelor aflate în G_1 (nu și în alte faze) care arată că acești nuclei intră de îndată în stadiul *S*, de sinteză a ADN. În 1957 Taylor, Woods și Hughes au efectuat experiențe autoradiografice la cromozomii de *Vicia faba*, folosind timidina tritiată (^{3}H) precursor al timinei. Radicelele crescute pe mediu cu timidină —^{3}H au prezentat cromozomii uniform marcați pe toată lungimea lor. Ele au fost apoi transferate pe mediu fără timidină tritiată (mediu „rece"). Radicele au fost tratate cu colchicină pentru a fi prevenită formarea fusului de diviziune astfel că produșii replicării fiecărui cromozom rămîn uniți la nivelul centromerului. S-au efectuat preparate citologice pentru cromozomi după un ciclu de diviziune, după două cicluri etc. Cînd au fost analizate autoradiografic aceste preparate, autoradiogramele cromozomilor din radicele cultivate pe mediu cu timidina tritiată prezentau ambele cromatide marcate radioactiv (Fig. 22). Cînd s-au efectuat preparate din radicele cultivate pe mediu radioactiv și apoi transferate pe mediu neradioactiv (fără timidină —^{3}H), pentru un singur ciclu celular (o singură diviziune), cromozomii din această a doua metafază statmochinetică de după marcare prezentau o cromatidă marcată și alta nemarcată. Aceasta a fost prima dovadă experimentală certă în sprijinul modelului semiconservativ de replicare a ADN. El a fost dovedită și la alte organisme vegetale precum *Crepis* și *Bellevalia*. Dar era

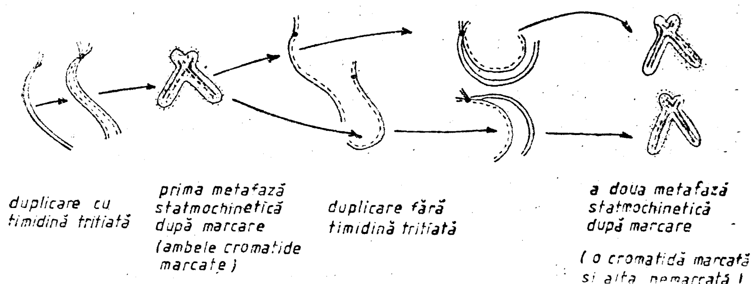


Fig. 22. Modelul replicării semiconservative a cromozomului eucariot (după (Taylor, Woods și Hughes, 1957).

o dovadă indirectă a replicării ADN, prin care de fapt se dovedea replicarea semiconservativă a cromozomilor.

Dovadă directă, la nivel molecular, a replicării semiconservative a ADN a fost adusă în 1958 de către Meselson și Stahl, prin experiențe de transfer izotopic (Fig. 23). Autorii au crescut pentru multe generații celulare *E. coli* pe mediu în care în

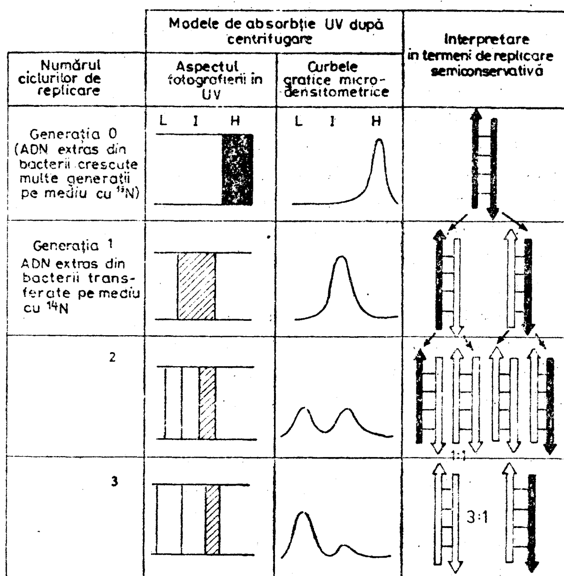


Fig. 23. Reprezentarea grafică a experienței lui Meselson și Stahl (1958). L — light = ușor (ADN cu ^{14}N) ; I — intermediar (ADN hibrid ^{14}N—^{15}N) ; H — heavy = greu (ADN cu ^{15}N). (Modificat după Lewis și John, 1970).

sursa de azot (NH_4Cl) intra nu azotul normal ^{14}N ci izotopul său greu ^{15}N, astfel că în macromolecula ADN atomii de N erau reprezentanți de ^{15}N. În prealabil s-au făcut cercetări de ultracentrifugare și s-a constatat că ADN cu ^{14}N bandează diferit (mai sus în tubul de centrifugă) față de ADN cu ^{15}N care bandează la un nivel inferior, spre fundul tubului de centrifugă. După creșterea bacteriei pe mediu cu ^{15}N pentru multe generații, celulele sînt transferate pe mediu cu ^{14}N pentru a desfășura un singur ciclu de diviziune (a cărui durată era precis determinată — 90 minute). S-a extras ADN și s-a ultracentrifugat. S-a constatat că acest ADN bandează la un nivel intermediar între ^{14}N și ^{15}N. Cu alte cuvinte acesta era un ADN hibrid, în care o catenă prezenta ca atomi de N, azotul normal ^{14}N iar catena complementară prezenta izotopul greu al acestuia ^{15}N. După două generații celulare de la transfer pe mediu cu ^{14}N se constata că proporția de ADN hibrid ^{14}N — ^{15}N scade la jumătate, cealaltă jumătate fiind reprezentată de ADN cu ^{14}N, după trei generații raportul dintre cantitatea de ADN hibrid și ADN cu ^{14}N este de 1 : 3 ș.a.m.d. (Model semiconservativ de replicare a ADN propus de către Watson și Crick în 1953).

Modelul semiconservativ de replicare a ADN asigură o continuitate a fenomenului ereditar, căci cele două noi molecule bicatenare de ADN sînt identice pe de o parte între ele, iar pe de altă parte sînt identice cu macromolecula inițială (parentală) de ADN care și-a „topit" identitatea în sinteza moleculelor fiice. Primul eveniment al replicării ADN este desfacerea, separarea catenelor complementare ale dublului helix din care cauză molecula de ADN la punctul de replicare are formă de *y*, această structură fiind numită *bifurcație de replicare*. ADN este replicat cu ajutorul unui complex multienzimatic numit „aparat de replicare". Ansamblul de evenimente care realizează replicarea ADN a fost convențional împărțit în inițierea, continuarea și terminarea replicării, etape care se pot întîlni și în sinteza altor macromolecule informaționale (ARN și proteine). ADN natural se află sub formă de structură terțiară, structură în care el este superspiralizat. La eucariote tururile superspiralizate din ADN liniar rezultă în urma asocierii sale cu proteinele bazice — *histone;* pe cînd la procariotele, la care macromolecula ADN este circulară, tururile superspiralizate sînt formate prin intervenția unei enzime speciale care s-a numit *ADN giraza,* aceasta acționînd chiar din momentul replicării. Tururile superhelicale pot să apară și ca rezultat al desfacerii (desfășurării) dublului helix în

timpul replicării. Din cauza vitezei mari cu care are loc desrăsucirea dublului helix în fața bifurcației de replicare, mai ales la moleculele circular închise se formează o superspiralizare, astfel că o etapă necesară în replicarea ADN este îndepărtarea structurilor terțiare superspiralizate. În acest proces intervin enzime care relaxează tensiunea de răsucire, prin crestarea unei catene înaintea bifurcației și astuparea acestei crestături după ce s-a realizat relaxarea. Aceste enzime s-au numit *enzime de crestare-astupare*, descrise atît la procariote cît și la eucariote. S-a mai descris și enzima ADN-*topoizomeraza*, o enzimă care introduce o crestătură monocatenară tranzitorie în duplexul ADN, oferind astfel un pivot pentru despiralizarea superhelicelor.

Pentru desfacerea punților de hidrogen dintre catenele complementare în vederea replicării intervine o enzimă destabilizatoare a dublului helix care a fost numită *unwindază*.

Catenele complementare separate funcționează ca matriță pentru sinteza de noi catene complementare. Nucleotidele 5′-trifosfat libere din mediu se aliniază pe matriță, împerechindu-se cu bazele complementare de pe aceasta cu stabilirea unor punți de hidrogen. Enzima ADN *polimeraza* dependentă de ADN catalizează formarea legăturilor covalente fosfodiesterice dintre nucleotidele învecinate. Inițial a fost descrisă enzima polimerazică *ADN polimeraza I* sau *enzima lui Kornberg* ca avînd rol esențial în replicare, dar cercetări ulterioare au stabilit că ea intervine numai într-o etapă ulterioară a procesului avînd rol esențial în sinteza reparatorie. Astăzi este unanim acceptată intervenția în etapele inițiale ale replicării ca și în alungirea catenei nou sintetizate a enzimei polimerazice desemnată ADN *polimeraza III*.

Toate enzimele polimerazice cu capacitatea de a alungi numai catene polinucleotidice deja existente, nu însă și de a iniția sinteza „de novo“ a unei catene. Pentru aceasta ele necesită un element ajutător prin care se primează (inițiază) o asemenea sinteză. În calitate de *primer* poate fi folosit un mic segment de ARN lung de cîteva nucleotide. De aceea primul eveniment în replicare după destabilizarea („topirea“) dublului helix este sinteza prin intervenția enzimei ARN *polimerază* a unui ARN *primer*. Acesta oferă ADN *polimerazei* un capăt 3′—OH liber al cărui nucleotid este împerecheat cu o bază complementară din matriță. Acum ADN *polimeraza* catalizează reacția de condensare a acestei grupe 3′—OH a primerului și a grupei 5′-fosfat a primului nucleotid 5′-trifosfat aliniat pe

matriță cu realizarea primei legături covalente fosfodiesterice. Replicarea ADN este astfel inițiată. Are loc alungirea noii catene, capătul 3′—OH al fiecărui nucleotid aliniat servind de fiecare dată ca primer, din care cauză catena de ADN nou sintetizată se mai numește și *ADN primer*. Procesul continuă pînă ce este folosită întreaga matriță avînd loc sinteza cîte unei catene complementare matrițelor cu formarea a două molecule fiice identice de ADN.

Toate ADN polimerazele dependente de ADN pot cataliza adăugarea de nucleotide la o catenă primer numai ca răspuns (în virtutea complementarității bazelor azotate) la secvența de baze pe care o găsesc pe o a doua catenă, catena matriță. Astfel dacă un grup 3′—OH liber de pe o catenă primer stă opus unei timine pe catena matriță (*template*) polimeraza va permite atașarea numai a unui dezoxiadenozintrifosfat (*d*ATP) la catena primer chiar dacă *d*CTP, *d*TTP și *d*GTP se află în mediu. *Cînd în mediul de reacție se află un amestec conținînd* ADN polimeraze și nucleozid-trifosfați împreună cu fragmente de ADN, aceste fragmente pot servi atît ca primer cît și ca matriță.

Polaritatea opusă a catenelor-matriță, 3′→5′ a uneia și 5′→3′ a celeilalte a ridicat problema existenței a două polimeraze care să dirijeze polimerizarea, una în direcția 5′→3′, alta în direcția 3′→5′. Aici s-a înregistrat dilema centrală a replicării ADN dat fiind faptul că nu au fost descoperite două enzime polimerazice care să polimerizeze în direcții opuse. Cercetări recente au stabilit însă că în replicare intervine o singură enzimă esențială, *ADN polimeraza III*, care are specificitate de direcție, nu de secvență de nucleotide. Astfel, această enzimă se deplasează numai în direcția 3′→5′ pe ambele catene-matriță, determinînd polimerizarea noilor catene (replicilor) numai în direcția 5′→3′. Comportamentul polimerazei III nu este în acord cu modelul inițial de replicare propus de Kornberg, în care se acorda rol esențial enzimei ADN polimeraza I, enzimă care ar fi determinat o sinteză continuă a noilor catene. Experiențele de *marcare pulsatorie* (pentru scurt timp) cu timidina tritiată efectuate de către Okazaki și colab. între 1968—1970 au adus dovezi pentru existența unui model discontinuu de replicare în care noile catene sînt sintetizate pe segmente mici — *fragmentele Okazaki* — de 1000—2000 nucleotide, care apoi sînt unite prin punți fosfodiesterice covalente prin activitatea enzimei ADN-*ligaza* în segmente mai mari și în ultimă instanță rezultă o catenă continuă nou sintetizată,

replică a matriței (complementară acesteia). În acest caz, sinteza fiecărui fragment Okazaki este primată de un segment de ARN primer sintetizat prin intervenția ARN polimerazei. După sinteza fragmentului Okazaki, ARN primer este excizat. Golul rămas în urma exciziei este umplut prin activitatea polimerazei I. La nivelul bifurcației de replicare sinteza fragmentului Okazaki se continuă de pe o catenă pe cealaltă, ADN polimeraza III sărind de pe o catenă pe cealaltă și determinînd polimerizarea pînă ce întîlnește originea replicării în cazul primului segment replicat sau bariera segmentului ADN deja replicat în cazul următoarelor segmente replicate. În acest caz intervine o enzimă *endonucleazică* care determină o incizie monocatenară în segmentul ADN nou sintetizat ce se continuă de pe o catenă pe cealaltă în urma căreia apare un capăt reactant 3'—OH făcînd ca procesul de replicare să se continue, iar bifurcația de replicare să se deplaseze secvențial de-a lungul întregii matrițe avînd loc o progresivă desfășurare a dublului-helix (Fig. 24A). Acesta este modelul „cuțitului și furculiței" propus de R. Barzilai și C. Thomas ca o variantă a modelului propus de Okazaki și colaboratorii în care în cadrul sintezei

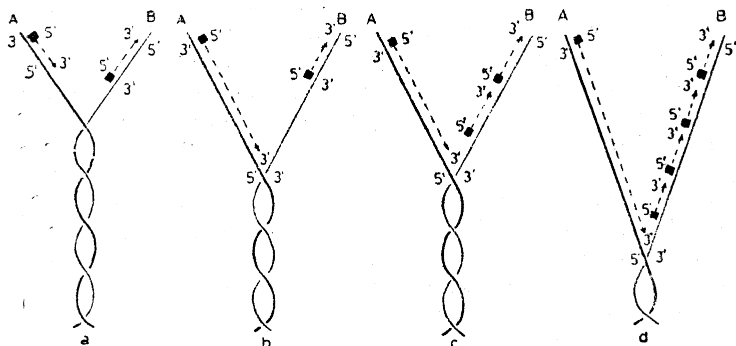


Fig. 24A. Replicarea ADN după modelul Okazaki-Kornberg. Se prezintă o secvență de evenimente (a—d) de despiralizare și de replicare segmentară la nivelul bifurcației unui dublu-helix ADN. ADN—polimeraza catalizează sinteza ADN numai în direcția 5'→3', deplasîndu-se pe ambele catene-matriță doar în direcția 3'→5', sărind, la nivelul bifurcației de pe o catenă pe celaltă, a) Despiralizarea dublei-elice (blocurile negre reprezintă puncte de inițiere a segmentelor Okazaki putînd fi scurte fragmente de ARN-primer). A și B reprezintă catenele-matriță. b) Pe măsura despiralizării, o porțiune din catena B rămîne temporar sub formă monocatenară pînă ce o nouă moleculă de ADN polimerază pătrunde la nivelul bifurcației spre a umple golul. c) ADN polimeraza determină pe catena A (catena *leading* = conducătoare) o sinteză continuă, pe cînd pe catena B (*lagging* = întîrziată) sinteza este discontinuă (segmentară).

discontinue se sintetizează segmente scurte de ADN atașate la matriță numai prin intermediul punților de hidrogen. După o scurtă perioadă de sinteză pe una din matrițe, un segment monocatenar al celei de-a doua catene parentale (matriță) stă expus. Intervine o a doua moleculă de ADN polimerază la nivelul bifurcației și copiază acest segment expus al celei de-a două matrițe în direcție inversă față de prima matriță (dată fiind polaritatea lor opusă) dar în aceeași direcție chimică permisă, adică 5'→3' ca pe prima matriță.

Modelul de replicare discontinuă propus de Okazaki a fost unanim acceptat și s-a dovedit a fi aplicabil la toate sistemele biologice. Este posibil ca replicarea pe o catenă să fie înaintată (sau unirea segmentelor Okazaki să fie mai rapidă) iar pe catena complementară să fie mai întîrziată (Fig. 24B).

Replicarea este reacția cea mai importantă din lumea vie și desfășurarea ei cade, după cum este și firesc, sub incidența unui strict control celular. Controlul este efectuat la mai multe nivele. La nivel molecular există mecanisme care asigură corecția replicării căci o bază azotată greșit împerecheată cu baza complementară din matriță face ca desfășurarea polimerizării să nu fie continuată pînă ce nu este îndepărtată baza azotată greșit împerecheată. La baza unei asemenea activități de corecție stă se pare activitatea ADN polimerazei I. Greșelile de încorporare datorate acțiunii unor agenți mutageni sau ineficacității în corecție a ADN polimerazei I stau la baza unuia dintre mecanismele de apariție a mutațiilor.

Dacă la procariote (bacterii, actinomicete) replicarea nu este restrînsă la o fază anume a ciclului celular, ea fiind potențial continuă în condiții optime de mediu pe parcursul întregului ciclu celular, la eucariote replicarea este restrînsă la o fază bine delimitată a ciclului celular plasată în interfază și care a fost numită *faza de sinteză S*. Durata fazei S este variabilă nu numai la diferitele specii dar și în cadrul aceluiași individ la nivelul celulelor aflate în diferite stadii de dezvoltare, fiind mai scurtă în stadiile timpurii ale embriogenezei față de celulele somatice diferențiate. De asemenea faza S premergătoare meiozei este foarte lungă comparativ cu aceea din ciclul mitotic.

Cromozomii eucariotelor reprezintă totodată structuri complexe în care ADN este permanent complexat cu proteine bazice de tip histonă. Replicarea cromozomului eucariot se realizează asincron nu numai între diferiți cromozomi neomologi ai complementului cromozomal al unei celule dar chiar la nivelul

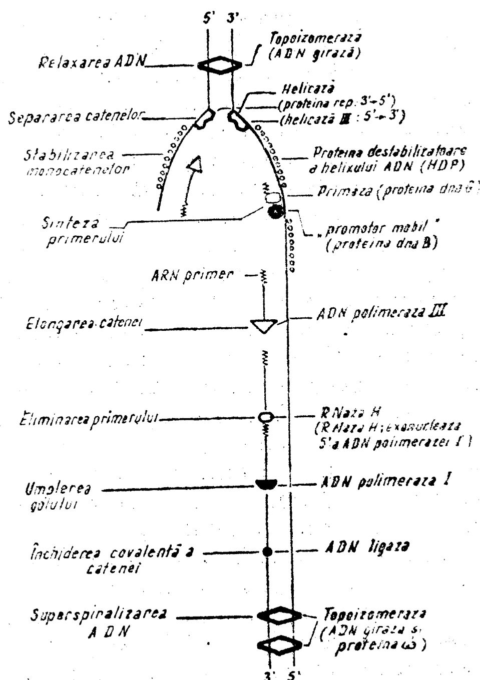


Fig. 24. B. SCHEMA COMPLEXULUI ENZIMATIC CARE PARTICIPĂ IN REPLICAREA ADN : pentru simplificare se arată în detaliu doar sinteza catenei succesoare („lagging") care, spre deosebire de catena directoare („leading") are o direcţie de sinteză opusă direcţiei de mişcare a bifurcaţiei de replicare. În dreapta schemei se redă denumirea proteinei sau enzimei participante în replicare, iar în stînga se trece funcţia pe care aceasta o îndeplineşte. În paranteză este trecută denumirea enzimelor sau proteinelor detectate la bacteria *E. coli.*

Relaxarea ADN este necesară spre a permite înaintarea bifurcaţiei de replicare, îngreunată de torsionarea duplexului circular ADN. Această torsionare este îndepărtată prin acţiunea unor enzime care au capacitatea de a introduce crestături monocatenare tranziente în duplexul ADN ceea ce permite rotaţia liberă în jurul celeilalte catene. Aceste enzime s-au numit iniţial swivelază (pivotază), enzimă de crestare-închidere, enzimă de relaxare a ADN sau *unwindază*, dar acum poartă numele de *topoizomerază* ADN, însemnînd enzimă ce determină schimbări în conformaţia macromoleculei ADN. *Topoizomeraza* are două subunităţi ce constituie un tetramer. Una din aceste subunităţi funcţionează ca topoizimerază propriu-zişă adică ca enzimă de relaxare, fiind sensibilă la acid nalidixic-un foarte eficient inhibitor al replicării ADN, pe cînd cea de a doua subunitate a topoizonerazei acţionează ca ADN *girază* sau proteină omega, introducînd tururi superhelicale în ADN nou sintetizat.

Helicaza ADN realizează separarea catenelor prin ruperea punţilor de hidrogen folosind energia provenită prin defosforilarea ATP dependentă de ADN.

unuia și aceluiași cromozom. Cromozomul eucariot este deci o structură multirepliconică, prezentînd la nivelul său mai multe puncte de inițiere a replicării.

Hubermann și Riggs (1968), extrăgînd ADN din celulele „Hela“ marcat pulsatoriu, au măsurat lungimile variate ale segmentelor marcate pulsatoriu reușind să calculeze că viteza de replicare este de 1 μm/minut (la *E. coli* aceasta este de 30 μm/minut). Un cromozom uman de lungime medie are circa 30 000 um ADN iar cromozomul eucariot are a singură moleculă de ADN. Dacă replicarea ar fi inițiată la un capăt al cromozomului și s-ar desfășura secvențial spre celălalt capăt ar fi necesare 500 ore pentru replicarea ADN al unui cromozom. Dar se știe că replicarea are loc în 6—8 ore. Aceasta a adus încă o dovadă că la eucariote cromozomul are un număr mare de unități de replicare de lungimi diferite cu un comportament relativ independent în replicare (Fig. 25).

Distribuția produșilor de replicare (cromozomii fii) se realizează la eucariote prin intervenția unui complex mecanism mitotic care este strict controlat ereditar. Replicarea ADN este supusă unui control riguros, la nivel molecular, dar ea cade

←

Helicaza de *E. coli* se numește *proteina rep.* și ea se deplasează pe monocatena ADN în direcția 3'→5' îndepărtînd catena complementară, pe cînd *helicaza III* se deplasează în direcția 5'→3' avînd aceeași acțiune. Acțiunea lor complementară este facilitată de prezența proteinelor neenzimatice *unwindaze* (HDP) sau proteine de topire a duplexului ADN. Aceste proteine asigură stabilizarea monocatenelor spre a putea servi ca matrițe.

Sinteza fragmentelor Okazaki este inițiată prin sinteza unui ARN primer catalizată de enzima ADN *primaza* (ARN polimeraza) produs al genei *dna G* care acționează sinergic cu produsul proteinic al genei *dna B*. Proteina dna B este o ATP-*ază* dependentă de ADN care se deplasează pe matrițe folosind energia eliberată prin defosforilarea ATP. Ea marchează la anumite distanțe pozițiile pentru sinteza primerului de către ADN *primază*, din care cauză s-a numit „promotor mobil".

După primare se realizează elongarea catenei (polimerizarea nucleotidelor) sub cataliza ADN polimerazei III. Eliminarea primerului ARN se face sub acțiunea RN*azei H* sau a activității exonucleazice 5' a ADN polimerazei I. Golul rămas după excizia primerului este umplut prin acțiunea polimerizatoare a ADN *polimerazei I*. Intervine apoi ADN *ligaza* care realizează închiderea covalentă a catenei (unirea prin punți fosfodiesterice a fragmentului Okazaki recent sintetizat cu cel precedent, realizîndu-se astfel treptat sinteza unei catene unice — catena nou sintetizată sau replica). După realizarea replicării intervine ADN *giraza* sau proteina omega spre a conferi moleculei fiice de ADN starea supespiralizată, stare care este normală, stabilă, fiind cerută se pare de funcționarea sa în replicare, transcriere și recombinare (După WACKERNAGEL, W. — 1980 — Replication (in:) Progress in Botany, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NewYork, 154—170).

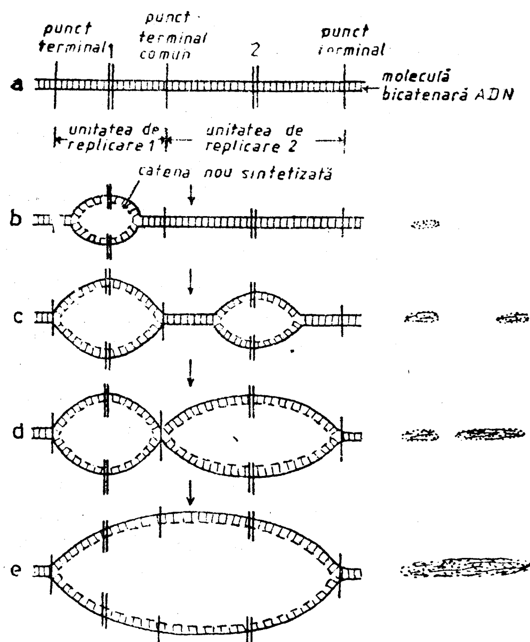


Fig. 25. Modelul lui Huberman şi Riggs (1968) de replicare a ADN eucariot. Sînt reprezentate două unităţi de replicare adiacente care apar adesea şi în imaginile autoradiografice ale fibrei de cromatină. Cele două unităţi de replicare desemnate 1 şi 2 au fiecare cîte un punct de iniţiere a sintezei ADN I_1, respectiv I_2, la nivelul cărora se constituie în timpul replicării buclele de replicare (ochi de replicare) corespunzătoare. Fiecare unitate de replicare are un punct terminus indicat prin bare transversale. a) Inainte de replicare. b) Replicarea a început în unitatea 1 dar nu încă în unitatea 2. c) Replicarea este completă în unitatea 1 şi a început în unitatea 2. d) Replicarea este completă în ambele unităţi. e) Dublu-helixurile fiice separate în punctul terminal comun dar sînt încă unite cu segmentele adiacente. În dreapta se reprezintă schematic „*grainurile*" observate în autoradiografie.

şi sub incidenţa unor semnale venite din citoplasmă. În urma unor fuziuni celulare dintre celule aflate în S şi G_1 are loc o sinteză prematură de ADN în nucleul aflat în G_1 urmată de condensarea prematură a cromozomilor. Condensarea cromatinei cromozomale poate duce la acoperirea şi deci la reducerea numărului unor puncte de iniţiere a replicării. Cromatina condensată numită heterocromatină prezintă o replicare tardivă în faza S comparativ cu cromatina difuză — eucromatina.

ADN are capacitatea de a exercita un anumit autocontrol al replicării sale, prin care este prevenită reactivarea secvențelor de inițiere imediat după ce acestea au funcționat în replicare. În acest proces de autocontrol un rol esențial se pare că îl au diferitele fracțiuni de ADN *satelit* (secvențe simple de ADN, dar înalt repetate localizate de regulă la nivelul regiunilor centromerice) dar mai ales ADN cu secvențe mijlociu repetate, incluzînd secvențele repetate cu simetrie rotatorie inversă numite *palindroame* de tip ABC XY C'B'A', precum și secvențe poli — (AT) de vreme ce ADN satelit nu se află la toate speciile. Un rol esențial în replicarea ADN îl joacă sinteza ARN sub cataliza ARN *polimerazei*, acest ARN condiționînd inițierea replicării ADN, fiind se pare vorba de un ARN*m* de inițiere la eucariote. Replicarea ADN este însoțită și de sinteza de proteine histonice.

Cel mai important este însă reglajul genetic al replicării.

La eucariote există un *control intracromozomal* al replicării. Toți repliconii dintr-un cromozom eucariot, avînd dimensiuni diferite, trebuie să funcționeze în cadrul aceleiași perioade *S* din interfază, repliconii de la nivelul heterocromatinei (bogată în AT) funcționînd spre sfîrșitul acestei perioade *S*, pe cînd cei de la nivelul eucromatinei (bogată în GC) funcționează la începutul acesteia. Cromozomul Y de drosofilă, care este în cea mai mare parte heterocromatic, se replică mai tîrziu față de ceilalți cromozomi și acest lucru este valabil și atunci cînd are loc translocarea unor părți ale sale în cromozomi eucromatici. Aceasta înseamnă că părțile cromozomului Y conțin informația care reglează timpul replicării lor.

La eucariote replicarea ADN nuclear și extranuclear este reglată și *la nivelul celular*. Pentru replicarea ADN este necesară enzima *timidinkinază* care este sintetizată înainte de mitoză și este hidrolizată sau inactivată după realizarea replicării. Sinteza ADN încetează cînd s-a atins nivelul 4 *C*, ceea ce presupune un mecanism fin de control celular al replicării ADN.

În dezvoltarea timpurie a ovulelor are loc replicarea nucleară fără a avea loc replicarea celulară. Toate cazurile de endoreduplicare, poliploidie și polinemie arată absența unei coordonări replicare ADN — diviziune nucleară sau celulară.

Faptul că replicarea ADN este dependentă de factori citoplasmatici este demonstrat de constatarea că nucleii din neuronii adulți nu sintetizează ADN în mod normal. Dacă însă

acești nuclei sînt transplantați în ovule activate partenogenetic ale aceleiași specii, în acești nuclei are loc replicarea ADN la numai o oră de la transplantare. De asemenea, cînd nuclei din blastula medie care sintetizează ADN sînt transplantați în ovocite în creștere care nu mai sintetizează ADN, nucleii transplantați încetează sinteza ADN.

Cînd la celulele „HeLa" se asociază experimental nuclei și citoplasmă din stadii diferite ale ciclului celular sinteza ADN este inițiată numai dacă nucleii din G_1 sînt plasați în citoplasma aflată în faza S.

S-a tras conluzia că citoplasma S trebuie să conțină unul sau mai mulți factori care promovează sinteza ADN nuclear. Este posibil ca acești factori citoplasmatici să aibă origine nucleară.

Replicarea ADN este reglată de asemenea *la nivelul țesuturilor și organelor.* Sînt date după care evenimentele desfășurate la nivelul membranei nucleare pot influența sinteza ADN nuclear. Desfășurarea mitozei, frecvența diviziunii, orientarea fusului mitotic, incapacitatea anumitor cromozomi sau părți din cromozomi de a se distribui în timpul mitozei, frecvența recombinării mitotice ca și distribuția cromozomilor în meioză în urma sinapsei cromozomale sînt controlate genetic.

Amplificarea genică sau extrareplicarea anumitor segmente din genom, în special a genelor ribozomale, se desfășoară atît în celulele diploide cît și în celulele endopoliploide ducînd la sinteza unui ADN*r* amplificat, labil metabolic, fiind degradat după ce și-a îndeplinit funcția de transcriere (sinteza ARN*r*). Recent, Mihăescu și Gavrilă (1980) au evidențiat fenomenul de amplificare a genelor ribozomale în celulele de mamifer în cultură infectate cu adenovirus, tratate în prealabil cu tioacetamidă. Uneori ADN amplificat nu este transcris așa cum este cazul cu ADN de la nivelul *pufelor* insectelor *Sciaride* sau dacă este transcris, ARN sintetizat nu este transportat în citoplasmă, acest ADN amplificat, repetitiv, localizat de regulă la nivelul regiunilor heterocromatice ale genomului putînd juca în principal rol reglator.

Hormonii animali și fitohormonii pot juca un rol important în determinarea unei replicări diferențiate a ADN. Cromomerele cromozomului eucariot al căror ADN suferă o replicare amplificată de ADN s-au numit *ampliconi.* Amplificarea și sub-

replicarea nu sînt fenomene alternative, ci coexistente. Astfel, în celulele suspensorului embrionar de la *Phaseolus* se află cromozomii politeni, la nivelul cărora apare un fenomen de amplificare genică a ADN satelit. În același timp apare un fenomen de subreplicare a segmentelor ADN care cuprind genele ribozomale. Conținutul total de ADN nuclear apare însă ca un multiplu al valorii diploide.

Capitolul II

STRUCTURA ARN ŞI TRANSCRIEREA GENETICĂ

1. GENERALITĂŢI

ADN are două funcţii primare: funcţia autocatalitică, realizată în procesul replicării sale şi funcţia heterocatalitică realizată în procesul de sinteză de molecule specifice, în speţă proteine.

Dacă ADN reprezintă substanţa macromoleculară cu funcţie primară ereditară, ARN este implicat în realizarea decodificării informaţiei ereditare care are loc în procesul de biosinteză proteinică, cînd secvenţa de nucleotide din ADN este mai întîi transcrisă în ARN mesager şi apoi tradusă în secvenţă de aminoacizi a catenelor polipeptidice. Încă din anul 1952, A. Dounce a arătat pentru prima dată că ADN îşi îndeplineşte funcţia heterocatalitică în două etape: transcrierea şi traducerea mesajului genetic.

Ca şi ADN, ARN este o substanţă macromoleculară, polimer al unor *ribonucleotide*, avînd de regulă structură monocatenară. Axul principal al monocatenei este reprezentat de o coloană glucidofosforică la care sînt ataşate bazele azotate (Fig. 26). Ca pentoză, în ARN intră D-*riboza* care spre deosebire de 2-deoxi-D-riboza din structura ADN, are patru grupări hidroxil. Bazele azotate din ARN sînt două *purinice Adenina* şi *Guanina* şi două *pirimidinice Citozina* şi *Uracil*. Deci locul timinei este luat în ARN de uracil (U) care prezintă complementaritate pentru adenină. Legăturile fosfodiesterice creează o anumită polaritate a monocatenei ARN care va prezenta un capăt 3′ şi altul 5′.

În structura ARN, în afara bazelor tipice mai pot intra şi alte baze, unele modificate dintre care comun este nucleotidul pseudouridina şi dihidrouracilul mai frecvente în unele tipuri de ARN. În cazuri foarte rare, în structura ARN intră şi timina.

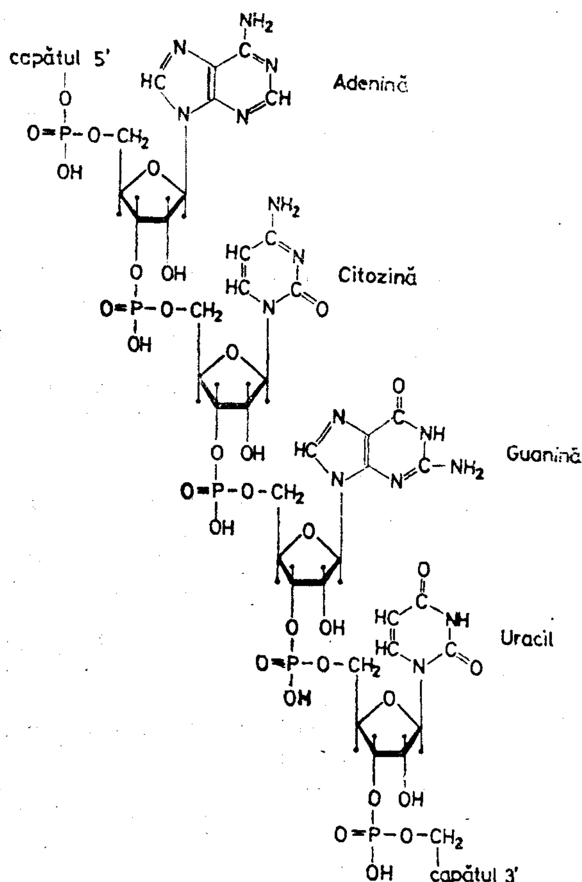


Fig. 26. **Formula chimică a unui poliribonucleotid.**

Spre deosebire de ADN, ARN prezintă o mare heterogenitate structural-funcțională.

Deși în general structura ARN este monocatenară, acesta poate prezenta prin pliere în urma potrivirii de secvențe complementare, regiuni bicatenare la nivelul cărora apar perechi de baze azotate unite prin punți de hidrogen.

Unele ribovirusuri prezintă în mod normal ca miez de acid nucleic ARN bicatenar cum este cazul reovirusului. De asemenea diferitele tipuri de ARN celular în special cel *ribozomal* și

de *transfer* pot prezenta regiuni bicatenare, separate de regiuni monocatenare.

Dată fiind structura principial monocatenară a ARN proporția de baze complementare A—U și G—C nu realizează de regulă raportul unitar. Monocatenele ARN au formă liniară, nefiind încă decelate molecule circulare de ARN. Numărul de nucleotide ce intră în structura diferitelor tipuri de ARN variază între 75 și 10.000.

Se pot distinge două categorii esențial diferite de ARN: ARN *viral* — materialul ereditar al ribovirusurilor și ARN *celular* — molecule care intervin în decodificarea informației ereditare și traducerea sa în secvențe aminoacidice în procesul de biosinteză proteinică celulară.

ARN viral. Este ARN care ca și ADN este înzestrat cu funcție genetică primară și anume funcție de depozitare a informației ereditare și transmiterea sa în generațiile virale succesive prin replicare. Se întîlnește la unele virusuri vegetale (VMT), la unii bacteriofagi (Qβ, R 17, MS_5), unele virusuri animale (polio, virusuri poliedrale citoplasmatice de la insecte etc.). Cantitatea de ARN viral reprezintă 1% din greutatea particulei virale cum este cazul virusului influenza sau 6% în cazul VMT.

De regulă ARN viral este monocatenar (VMT, virusul gripal, polio, fagi Qβ, R_{17} : F_2) sau bicatenar cu catene complementare (reovirus).

ARN celular. Acest tip de ARN nu codifică informație genetică și este sintetizat pe matriță ADN, adică transcrie informația genetică. Niciodată însă ARN celular nu îndeplinește funcție de matriță pentru propria sa sinteză, deosebindu-se principal de ADN sau de ARN viral. El îndeplinește însă funcția de *primer* în replicarea ADN.

2. TRANSCRIEREA GENETICĂ

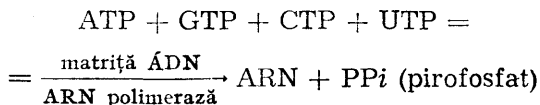
Transcrierea genetică reprezintă un proces complex desfășurat în mai multe etape, în care pe matriță de ADN se sintetizează monocatene ARN, asigurîndu-se transferul informației genetice de la ADN la ARN. În cadrul procesului enzima numită ARN *polimerază* — dependentă de ADN — recunoaște secvențe specifice de pe matrița ADN și catalizează polimerizarea unor ribonucleotide trifosfat libere, aliniate pe matrița

ADN în virtutea complementarității de baze azotate de tip A—U, T—A, G—C, C—G, primul partener al perechilor fiind baze azotate din ADN, al doilea fiind baze azotate ce sînt incluse în catena poliribonucleotidică. Matrița și catena poliribonucleotidică nou sintetizată formează un hibrid molecular ADN—ARN temporar, prin intermediul punților de hidrogen dintre bazele complementare. Ca substrat pentru ARN polimerază servesc cei patru ribonucleotidtrifosfați ATP, GTP, CTP și UTP. ARN polimeraza, spre deosebire de ADN-polimerază are capacitatea de a iniția sinteza „de novo" a unei catene polinucleotidice fără a necesita *primer*. Cel mai bine studiată este ARN *polimeraza* bacteriană.

ARN polimeraza bacteriană este o enzimă complexă alcătuită din 2 subunități α, o subunitate β, o subunitate β' și factorul alosteric σ. Ea are o greutate moleculară de 495.000 daltoni. Holoenzima se poate separa în miezul enzimatic și factorul σ. *Factorul* σ este factor de inițiere, el fiind acela care recunoaște o secvență specifică din ADN (promotorul), condiționînd formarea complexului ADN—ARN polimerază. După inițierea sintezei ARN factorul σ se desprinde de pe holoenzimă și se poate asocia cu un alt miez enzimatic căruia îi conferă specifitate pentru matrița ADN.

Procesul de transcriere cuprinde ca și în cazul replicării ADN o fază de inițiere a catenei ARN, o fază de elongare și o fază de terminare a transcrierii. Fiecare fază se desfășoară prin intervenția anumitor factori de inițiere, de elongare și de terminare. ARN polimeraza este dependentă de ADN, ceea ce înseamnă că ea funcționează numai în prezența matriței ADN. Catena din duplexul ADN care funcționează ca matriță în sinteza ARN, care este deci transcrisă, se numește *catenă sens*.

Procesul de inițiere a transcrierii presupune mai întîi preinițierea în care are loc formarea unui complex molecular ADN-ARN polimerază, enzima recunoscînd prin factorul σ o secvență specifică din matrița ADN cu care se asociază intim. Urmează apoi formarea complexului de inițiere propriu-zisă a transcrierii și în care este inițiată polimerizarea secvențială a ribonucleotidelor cu desfășurarea alungirii catenei poliribonucleotidice (ARN), prin formarea de punți fosfodiesterice succesive. Transcrierea poate fi prezentată astfel:



$$\text{ATP} + \text{GTP} + \text{CTP} + \text{UTP} =$$

$$= \xrightarrow[\text{ARN polimerază}]{\text{matriță ADN}} \text{ARN} + \text{PP}i \text{ (pirofosfat)}$$

Creşterea catenei ARN are loc prin formarea punţilor fosfodiesterice succesive în direcţia 5' ⟶ 3', adică prin adiţia unui ribonucleotid-5'-fosfat la capătul 3'-OH al ribonucleotidului precedent.

Formarea punţilor fosfodiesterice (alungirea catenei ARN) este catalizată de miezul enzimatic al ARN polimerazei.

Ribonucleotidul iniţial 5' al unei catene ARN este de obicei un ribonucleotid trifosfat purinic (ATP sau GTP) care îşi păstrează toate grupele fosfat. Aceasta înseamnă că în matriţă, la situl de iniţiere a transcrierii diferitelor catene ARN se află fie dezoxitimidinmonofosfatul, fie dezoxicitidinmonofosfatul, ceea ce înseamnă că o grupare de pirimidine în matriţa ADN ar putea constitui situl de iniţiere a transcrierii ARN, recunoscut de către transcriptază prin factorul σ.

Situl din ADN la care se ataşează ARN polimeraza şi a cărui secvenţă este recunoscută în mod specific de factorul σ s-a numit *promotor*. El reprezintă o regiune mică din matriţa ADN de pînă la 50 nucleotide lungime, localizată imediat înaintea genei sau grupului de gene a cărei informaţie genetică trebuie transcrisă în ARN. De reţinut că secvenţa promotorului nu este transcrisă în ARN. Studiind iniţierea transcrierii ARN*m* specific pentru enzima β-*galactozidază,* Gilbert şi Maxam au stabilit în 1973 secvenţa de baze din punctul de iniţiere a sintezei ARN*m* care este următoarea:

↓
5' ..... TGGAATTGTGAGCCGATAACAATTTCA ..... 3'
3' ..... ACCTTAACACTCGGCTATTGTTAAAGT ..... 5'

Iniţierea sintezei ARN*m* pentru β-*galactozidază* este indicată prin săgeată. Se poate constata că secvenţa de baze, corespunzătoare sitului de iniţiere a transcrierii este bogată în perechi A—T. Iniţierea transcrierii poate fi inhibată în mod specific de antibioticul rifampicină la procariote sau α-amanitină la eucariote.

Şi alţi factori sînt implicaţi în controlul iniţierii transcrierii, cel mai important pentru bacterii fiind factorul proteinic CRP (proteina receptoare a catabolitului) numită încă factor CAP care reprezintă proteina receptoare a AMP ciclic, acest nucleotid monofosfat ciclic avînd rol important şi multiplu în reacţiile biochimice legate de decodificarea informaţiei genetice. Absenţa CRP sau chiar a AMP ciclic duce la descreşterea vitezei de iniţiere a transcrierii şi ca urmare a sintezei ARN.

Desfăşurarea transcrierii (elongarea catenei ARN) se realizează cu o viteză de 60 nucleotide pe secundă, dar viteza de transcriere poate fi influenţată de însăşi secvenţa care trebuie transcrisă, acesta fiind chiar un mecanism de reglare a transcrierii. Elongarea catenei ARN este inhibată specific de către antibioticul *streptolidigina,* care are afinitate pentru ARN polimerază, inactivînd-o. Acelaşi efect are acţiunea *actinomicinei D.* Terminarea sintezei ARN este directă, condiţionată de întîlnirea de către complexul tripartit de transcriere ADN — miezul enzimatic al ARN polimerazei — ARN născînd, a unui sit de terminare din cadrul secvenţei ADN ce este transcrisă cu eliberarea catenei ARN adică a transcriptului şi dezorganizarea complexului de transcriere. Transcriptul ARN începe la capătul său 5′ cu o aşa-numită *secvenţă ghid* sau *conducătoare (leader)* care poate avea pînă la 150 de baze şi include şi complementul operatorului (vezi reglajul genetic) sau al unei părţi a acestuia.

Terminarea transcrierii însă poate avea loc prin intervenţia unui factor proteinic care a fost desemnat factorul de terminare ρ (rho) care este alcătuit din 6 subunităţi identice aranjate în cerc şi care are capacitatea de a se lega la ARN *polimerază* spre a înceta transcrierea la nivelul unor bariere naturale ale transcrierii care apar în ADN reprezentate de secvenţe specifice de nucleotide localizate fie în cadrul secvenţei unei gene, fie între gene adiacente. Sinteza ARN se desfăşoară polarizat. Transcrierea începe la capătul 3′—OH al matriţei ADN şi sinteza ARN se desfăşoară în direcţia 5′ ⟶ 3′. Rezultă deci că matriţa şi transcriptul sînt antiparalele. În vederea transcrierii are loc o desfacere locală a dublului helix ADN în zona ce urmează a fi transcrisă şi apare astfel aşa-numitul *ochi de transcriere.* Pe măsură ce transcrierea se desfăşoară, în urmă se reface structura dublu-catenară a ADN la parametri săi iniţiali. Desfacerea locală în transcriere poate fi folosită şi în replicarea ADN.

In vivo transcrierea este asimetrică adică doar una din cele două catene ale dublului helix ADN serveşte ca matriţă pentru sinteza ARN. Dar acest lucru nu înseamnă că în toate cazurile una şi aceeaşi catenă a ADN este activă în transcriere iar cealaltă este inactivă. Pentru o genă dată sau un grup de gene (vezi operonul) o catenă ADN este activă în transcriere iar catena complementară inactivă, pe cînd, pentru altă genă sau alt grup de gene aceeaşi catenă ADN poate fi inactivă iar catena complementară poate fi activă în transcriere. Dar dacă un

segment al unei catene ADN este activ în transcriere segmentul corespunzător de pe catena complementară este în mod determinat inactiv în transcriere. Altfel s-ar sintetiza două transcripte care prezentînd complementaritate ar duce la formare de structuri bicatenare ARN, de regulă inactive în dirijarea sintezei proteinice. Factorul σ joacă rol esențial în selecția catenei active, căci în absența sa miezul enzimatic al ARN polimerazei nu prezintă specificitate de secvență și catenă, putîndu-se lega la orice secvență a oricăreia dintre cele două catene ale ADN. În prezența factorului σ însă, ARN polimeraza capătă capacitatea de a recunoaște secvența specifică de pe *catena sens* ce trebuie transcrisă.

În mitocondrii s-a stabilit existența unei transcrieri genetice simetrice, ambele catene ale ADN mitocondrial fiind active în transcriere, dar intervine și aici un mecanism specific care degradează rapid unul din cele două transcripte.

La procariote produsul imediat al transcrierii secvențelor din ADN ce specifică sinteza diferitelor proteine este un ARN *mesager policistronic,* adică care conține transcrisă informația genetică pentru mai multe proteine, sistemele de transcriere și de traducere fiind intim cuplate (Fig. 27), fapt care nu se evi-

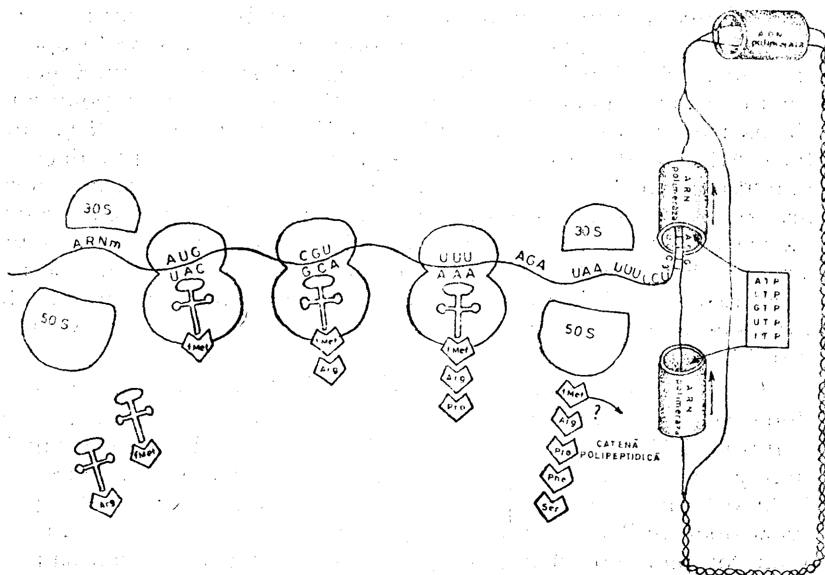


Fig. 27. Transcrierea și traducerea mesajului genetic la procariote sînt frecvent cuplate.

dențiază la eucariote unde transcrierea are loc în nucleu iar traducerea mesajului genetic are loc în citoplasmă, la nivelul ribozomilor. La eucariote produșii imediați ai transcrierii sînt mult mai mari decît produșii maturi astfel că ei sînt supuși unor prelucrări posttranscripționale prin care sînt pe de o parte modificate unele baze azotate (metilare, acetilare etc.) sau sînt excizate anumite secvențe de baze azotate iar uneori adăugate unele secvențe specifice de baze (adenilare). În urma acestor prelucrări posttranscripționale, ARN *mesager precursor* eucariotic devine un ARN *mesager monocistronic* matur care deține informația ce specifică o singură catenă polipeptidică. În reglarea transcrierii intervin factori inductori și represori bine evidențiați mai ales la procariote. La eucariote transcrierea ADN din cromozomi este dependentă de starea decondensată interfazică a cromatinei, starea condensată a cromozomilor mitotici sau a heterocromatinei nepermițînd transcrierea ADN. În vederea transcrierii la nivelul cromozomilor condensați are loc un proces de deslînare locală, cu apariția de *pufe* sau *inele Balbiani* în cazul cromozomilor politeni de diptere. Sinteza ARN are loc pe parcursul întregii interfaze și continuă și în profază cînd încetează, reîncepînd în telofază. Din această cauză s-a tras concluzia că ea este condiționată de integritatea membranei nucleare și a nucleolului. Aceasta poate fi justificat pentru sinteza ARN *ribozomal,* nu și pentru alte categorii de ARN. Mai sigur este că sinteza ARN este condiționată de starea difuză, decondensată a cromatinei.

Proporția din ADN la bacterii care este transcrisă este de ordinul a 80—100% pe cînd la eucariote aceasta este mult mai mică (2—20%) și este dependentă de tipul celular și de organismul considerat. Transcrierea la eucariote nu este cuplată nici temporar și nici spațial cu traducerea mesajului genetic.

Transcrierea a fost vizualizată electronomicroscopic atît la procariote cît și la eucariote (Fig. 28 A, B, C) de către Miller și colab. (1970).

Diferitele categorii de ARN celular intervin în etape specifice ale decodificării informației ereditare.

Se pot distinge mai multe tipuri de ARN celular: ARN *mesager,* ARN *ribozomal,* ARN *de transfer,* ARN *heterogen* și ARN *cromozomal.* Primele trei tipuri de ARN celular intervin direct în procesul decodificării.

3. *ARN mesager (ARNm)* a mai fost numit ARN *de informație.* Moleculele de ARN*m* sînt componente centrale în expresia genelor structurale. ARN*m* reprezintă 2% din ARN ce-

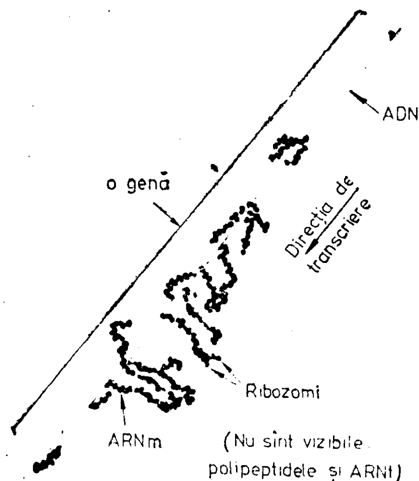


Fig. 28. A. Transcrierea genetică. la procariote. Interpretare după electronografie.

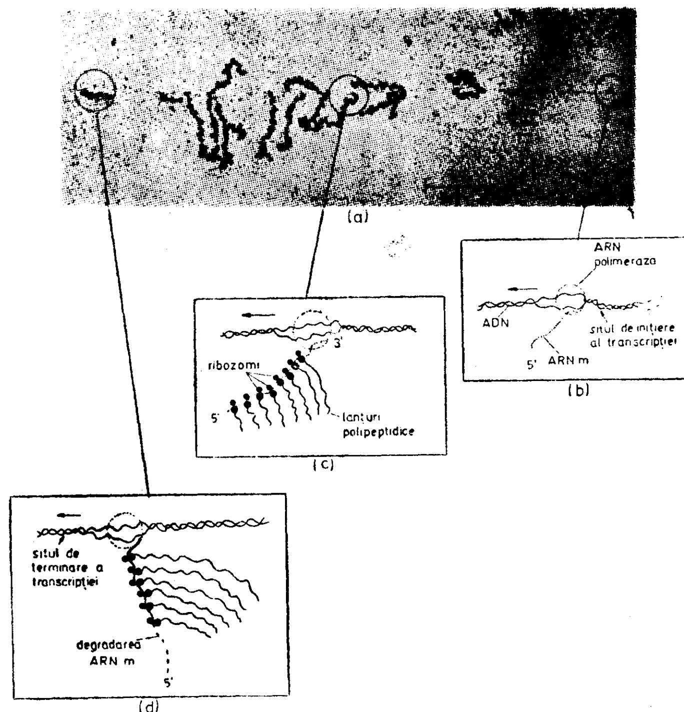


Fig. 28. B. (a) — un fragment de ADN de *E. coli* avînd atașate molecule ale enzimei ARN-polimerazei și ribozomi; (b—c) — diagrama zonei de inițiere a transcrierii cu redarea deplasării secvențiale a ARN-polimerazei spre stînga determinînd sinteza de ARN*m* pe matrița ADN. La aceste molecule de ARN*m* se atașează ribozomii, la capetele lor 5', traducînd secvența sa polinucleotidică într-o secvență de aminoacizi a polipeptidelor pe măsură ce aceasta se deplasează spre capătul „în creștere" 3' al mesagerului; (d) Degradarea ARN*m* începe cu capătul 5' și astfel nu mai are loc atașarea de ribozomi care se disociază.

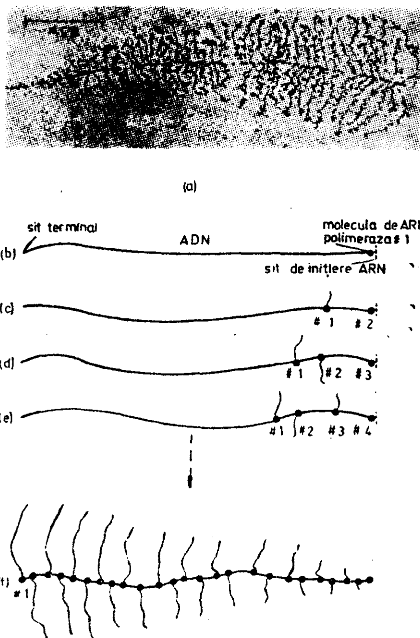


Fig. 28. C. Transcrierea la eucariote. (a). Electronografia unei secvențe ADN în procesul de transcriere în ovocita de *Triturus viridescens*. Moleculele de ARN transcrise pornesc radiar din axa ADN. La intersecția unei catene ARN și axei ADN se află un granul proteinic dens care cel mai probabil reprezintă molecule de ARN polimerază b—f. Secvența de evenimente redată diagramatic care duc la transcrierea unui segment ADN. (b). O moleculă de ARN polimerază (# 1) se atașează la un sit de inițiere pe o secvență de ADN ce trebuie transcrisă la un moment dat. (c). Molecula de ARN polimerază se deplasează pe catena ADN transcriind-o într-o secvență ARN. După ce polimeraza # 1 s-a deplasat pe un anumit interval, se atașează polimeraza # 2 la situl de inițiere și începe și ea transcrierea, ș.a.m.d. astfel că pe cînd molecula de ARN asociată cu ARN *polimeraza* nr. 1 reprezintă o secvență complementară la aproape întreaga lungime a unei catene ADN, celelalte asociate cu ARN *polimerazele* 2, 3, 4 etc. sînt progresiv mai mici. La terminarea transcrierii ARN *polimeraza* este eliberată împreună cu ARN transcris.

lular, avînd durată scurtă de viață. El transcrie informația genetică de pe un segment al unei catene a dublului helix ADN corespunzător unei gene care trebuie să funcționeze la un moment dat și funcționează ca matriță pentru sinteza sa. Segmentul din ADN care servește ca matriță pentru sinteze ARN*m* poate corespunde la o genă sau la mai multe gene care dețin informația genetică pentru sinteza unor proteine sau enzime

înrudite ce controlează un același caracter sau intervin în aceeași cale metabolică.

Dimensiunea diferitelor molecule de ARN*m* este în funcție de mărimea mesajului pe care îl poartă, adică corespunde secvenței de baze a diferitelor gene pe care le transcrie, gene care au la rîndul lor dimensiuni foarte diferite și care specifică în consecință catene polipeptidice de lungime variabilă.

Astfel, constanta de sedimentare a diferitelor molecule de ARN*m* de la același organism variază între 8 S și 45 S.

ARN*m* pentru ovalbumină cuprinde cca 1890 nucleotide. Unul dintre cele mai mari tipuri de ARN*m* este cel pentru *fibroina* firului de mătase din glanda posterioară de *Bombyx mori*. Acest ARN*m* are constanta de sedimentare de 32 *S* (Taylor, 1979).

Durata de viață a ARN*m* la procariote este de 2—4 minute. De îndată ce au fost traduse, moleculele de ARN*m* sînt distruse, evitîndu-se astfel alterările posibile din structura sa care ar duce la modificarea mesajului genetic și la sinteza de proteine modificate, sau la traducerea unui ARN*m* care nu este în conformitate cu cerințele de mediu celular care se schimbă rapid de la o perioadă de timp la alta.

Cele mai multe tipuri de ARN*m* prezintă la capătul 3′ al monocatenei o secvență poli (A) care este adăugată posttranscripțional și este implicată în conturarea duratei de viață a ARN*m*.

Complexul enzimatic care degradează ARN*m* procariot are capacitatea de a distinge diferitele tipuri de ARN*m* pe care le degradează în mod specific, degradarea fiind cuplată cu traducerea mesagerului.

La eucariote, la care durata de viață a celulei este mai mare și durata de viață a ARN*m* este mai mare, de cca 1—4 ore. Atît la procariote cît și la eucariote există situații în care ARN*m* are o durată de viață mai mare. Este cazul celulelor de *Bacillus cereus* induse să devină spori în care ARN*m* durează cca 6 ore și reticulocitelor mamiferelor în care 90% din sinteza proteinică este reprezentată de sinteza hemoglobinei iar cînd se maturizează pierd spontan nucleul, nemaifiind deci vreo matriță pentru sinteza ARN*m* pentru hemoglobină. Cu toate acestea, sinteza hemoglobinei este continuată pe seama ARN*m* sintetizat încă din stadiul nucleat și care persistă și funcționează mult timp (cîteva zile) după aceea.

În cazul dormanței adoptată de multe ouă la animale și semințele de plante, ARN*m* este menținut într-o formă stabilă pentru luni și chiar ani.

Moleculele de ARN*m* cu durata lungă de viață, cum sînt și cele din ovulele de broască care sînt păstrate multe luni înainte de a fi traduse, sînt protejate față de atacul enzimelor depolimerizatoare ribonucleaze prin asociere cu categorii speciale de proteine. Asemenea asocieri ARN*m* — proteine la eucariote care apar înainte de trecerea ARN*m* din nucleu în citoplasmă unde se asociază cu ribozomii — sedii ale sintezei proteinice — au fost numite *informozomi* sau *informofere*.

La bacterii, genele aflate în raport de contiguitate și înrudite metabolic (legate de aceeași cale metabolică) formează o unitate reglatoare care s-a numit *operon*. Ele sînt transcrise într-un ARN*m* *policistronic* ce poartă mesajul genetic pentru mai multe proteine. La scurt timp de la inițierea sintezei ARN*m* bacterian, ribozomii se atașează la aceasta și se deplasează de-a lungul său în urma ARN *polimerazei*, spre a asigura traducerea mesajului genetic.

De regulă, la eucariote ARN*m* este monocistronic și transcrie gene care dirijează sinteza de polipeptide. Aceste gene sînt de regulă reprezentate de secvențe unice, nerepetate din ADN. ARN*m* eucariotic se sintetizează sub forma unui precursor heterogen — numit și ARN *nuclear heterogen* care are o greutate moleculară de $5 \times 10^5 - 10^7$ daltoni. S-a mai numit *pre*-ARN*m*. Precursorul ARN*m* este supus prelucrărilor posttranscripționale în cadrul cărora vor fi eliminate nucleotide de la capătul 5′ al moleculei și totodată vor fi adăugate la capătul 3′, 50—200 resturi adenilat formînd un segment de acid poliadenilic care condiționează durata de viață a *ARN*m.

La procariote ARN*m* reprezintă copia exactă a secvenței genice,, fără a-i lipsi anumite segmente. La eucariote în cazul unor gene apar porțiuni (secvențe interpuse sau spațiatoare în cadrul secvenței genice codificatoare) care sînt transcrise în ARN*m* dar nu sînt traduse. O situație similară apare în cazul unor virusuri animale.

Asemenea secvențe spațiatoare apar în genele pentru catena β a hemoglobinei, în genele pentru imunoglobulină, ovalbumină și în genele ARN*t* și ARN*r*. Secvențele spațiatoare sînt implicate se pare în reglarea activității genice. Ele pot fi transcrise în ARN*m*, dar ulterior sînt excizate. Este admisă și posibilitatea ca la eucariote ARN*m* să fie sintetizat segmentar, segmentele fiind ulterior unite într-o monocatenă unică de ARN*m* în care nu sînt incluse și secvențele spațiatoare.

4. *ARN ribozomal (ARNr)*. ARN*r* reprezintă cca 80% din ARN celular total și intră în structura ribozomilor care sînt

particule ribonucleoproteinice implicate în biosinteza proteinică. Ribozomii conțin 40—60% ARN*r* și proteine bazice ribozomale. Ribozomii apar în citoplasma tuturor celulelor procariote și eucariote avînd un diametru variabil de 140—230 Å. Proteinele ribozomale în număr total de 53 la procariote și 70—80 la eucariote se leagă de ARN*r* prin legături necovalente, asigurînd stabilitatea structurală a ribozomului permițînd totodată atașarea altor tipuri de ARN la ribozom. Prin atașarea de ribozomi pe monocatena ARN*m* se păstrează conformația monocatenară a acestuia propice decodificării — traducerii mesajului genetic. Ribozomii se atașează la ARN*m* formînd *poliribozomi* sau *polizomi*, între ei fiind o distanță de 50—150 Å.

Ribozomii procariotelor au constanța de sedimentare 70 S (subunități 30 *S* și 50 *S*) pe cînd cei eucariotici citoplasmatici au constanta de sedimentare 80 *S* (subunități 40 *S* și 60 *S*) fără ca ribozomii eucariotici să constituie un grup uniform „80 *S*" căci greutatea lor moleculară variază de la 3,9 × 10^6 daltoni la plante la 4,55 × 10^6 la mamifere, schimbarea masei ribozomale bazîndu-se în special pe variația dimensiunii subunității mari ribozomale (60 *S*) de la 2,4 la 3,05 × 10^6 daltoni, variație care este determinată de variația cantitativă atît a ARN*r* cît și a proteinelor ribozomale asociate. Subunitatea ribozomală mică (40 *S*) a ribozomului eucariot nu s-a schimbat apreciabil în cursul evoluției eucariotelor. Ribozomii organitelor celulei eucariote, cloroplastici și mitocondriali sînt de tip procariot avînd constanta de sedimentare 60—70 *S*. Prin scăderea concentrației ionilor Mg^{2+} sub 0,35 mM, ribozomii bacterieni disociază în subunitățile 50 *S* și 30 *S*.

Greutatea moleculară a proteinelor bazice structurale ribozomale este de 25.000—26.000 daltoni. Proteinele ribozomale sînt heterogene fiind descrise două categorii, una *S*, corespunzătoare subunității ribozomale mici și alta *L* corespunzătoare subunității ribozomale mari. Fiecare categorie de proteine ribozomale are mai multe fracțiuni S_1—S_{21} și L_1—L_{32}. La eucariote fracțiunile celor două categorii de proteine ribozomale sînt mai numeroase. Ele sînt esențiale în funcționarea ribozomilor. Proteinele ribozomale L_7 și L_{12} au proprietăți contractile și se pare că sînt implicate în translocarea aminoacizilor în timpul sintezei proteinice.

Asamblarea ribozomului realizată la nivelul nucleolului este, cel puțin în parte, un proces autodirecționat, deci nedirecționat de alte structuri celulare preexistente. Sînt date după care unii ribozomi pot fi specific mesageri, cu funcție informațio-

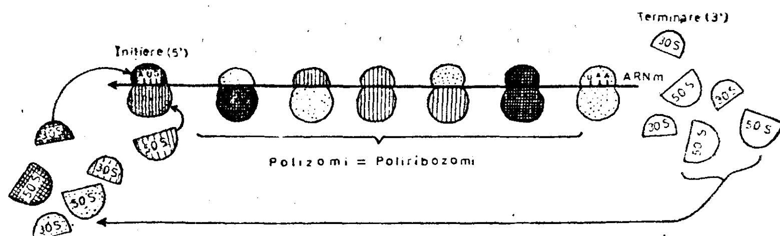


Fig. 29. Ciclul ribozomului. Subunitatea 30S se asociază cu ARN*m* după care are loc atașarea subunității 50 S.

nală. Se pesupune că ARN*r* posedă *in vivo* un mesaj tradus, specific pentru sinteza proteinelor ribozomale (Rieger și colab., 1968, 1976). Interesant este că ribozomii ca și cromozomii eucariotici sînt organite celulare, lipsite de membrane delimitante, care prezintă totodată — spre deosebire de alte organite ale celulei — un ciclu caracteristic de organizare și desfacere în vederea funcționării. Există astfel un ciclu ribozomal (Fig. 29) (vezi și sinteza proteinică) și un ciclu cromozomal (vezi organizarea genetică).* În celulele eucariote care sintetizează proteine pentru secreție-export, majoritatea ribozomilor sînt atașați la membranele reticulului endoplasmic prin intermediul subunităților mari 60 *S*. Ribozomii liberi neatașați la membranele reticulului endoplasmic sintetizează proteine care rămîn în citoplasma celulei. Se admite că în acest proces de selecție de către ribozomii atașați sau neatașați la reticulul endoplasmic a unui ARN*m* particular spre a fi tradus, un rol important îl joacă secvența lider din ARN*m* ce poate fi recunoscută în mod diferențiat de către cele două tipuri de ribozomi. De asemenea, proteinele destinate nucleului sînt sintetizate pe ribozomii citoplasmatici neatașați la reticulul endoplasmic. După sinteză, aceste proteine sînt pompate sau sucționate în nucleu. Se admite că și la procariote ARN*m* ce codifică proteine speciale sînt traduși în locuri speciale și probabil de către ribozomi speciali. Astfel, la *Bacillus* sinteza proteazei neutre, care este secretată în mediu, are loc pe ribozomi localizați la periferia celulei.

În subunitatea ribozomală mică intră ARN*r* de tip 16 *S* la procariote și 18 *S* la eucariote.

* Reunirea subunităților ribozomale spre a constitui particule ribozomale funcționale este aleatorie, ceea ce înseamnă că reciclarea subunităților ribozomale într-o nouă rundă de sinteză nu presupune asocierea acelorași subunități care au constituit ribozomii funcționali ai rundei precedente.

În subunitatea ribozomală mare intră ARN*r* de tip 23 *S* la procariote și 28 *S* la eucariote.

Atît la procariote cît și la eucariote asociat subunității ribozomale mari mai intră și un tip aparte de ARN*r*, care are constanta de sedimentare 5 *S*. În plus, la eucariote, s-a descris și un alt tip de ARN*r* care are constanta de sedimentare 7 *S* și care intră în componența subunității mari a ribozomului, existînd la eucariote deci 4 tipuri de molecule de ARN*r* (Wool, 1979).

Toate moleculele de ARN*r* atît la procariote cît și la eucariote se sintetizează sub formă de molecule precursoare de ARN*r* (*pre*-ARN*r*) care, după transcriere, sînt supuse prelucrărilor posttranscripționale. Acestea includ pe de o parte metilarea resturilor riboză la cca 5% dintre nucleotide, determinînd diferențieri calitative în funcția catenelor poliribonucleotidice, iar pe de altă parte clivarea unor secvențe (eliminarea) ducînd la reducerea lungimii *pre*-ARN*r* și delimitarea unei molecule mature de ARN*r*. După prelucrarea posttranscripțională structura primară monocatenară a ARN*r* poate suferi contorsionări spațiale cu realizarea de regiuni bicatenare și cu apariția unor modele spațiale caracteristice.

Genele (ADN*r*) pentru cele trei categorii de ARN*r* sînt dispuse în tandem (policistroni) în ADN (genom) și sînt transcrise în ordinea 16 *S* — 23 *S* la procariote. Aceste gene apar de asemenea strîns lincate, la eucariote fiind dispuse în ordinea 18 *S* — 28 *S* și transcrise ca un *pre*-ARN*r* unic care are o constantă de sedimentare 45 *S*. Acesta va fi separat prin prelucrările posttranscripționale ulterioare în cele trei tipuri de ARN*r* matur.

La eucariote, genele pentru sinteza ARN 18 *S* și 28 *S* se află în *regiunea organizator nucleolară (NO)* localizată la nivelul constricțiilor secundare implicate în formarea nucleolului. Rezultă că aceste gene ribozomale sînt gene nucleolare. Ele sînt regiuni vitale ale genomului de vreme ce mutantele de *Xenopus* desemnate D-nu în stare homozigotă lipsite de nucleol nu sînt capabile să sintetizeze ARN*r* și mor. Genele pentru ARN 5 *S*, prezente și ele în copii multiple la eucariote sînt nelincate cu celelalte gene ribozomale, fiind distribuite pe diverși cromozomi, în speță în regiunea telomerică a lor. Deși nelincate cu genele ribozomale 18 *S* și 28 *S*, genele ribozomale 5 *S* sînt transcrise coordonat cu genele pentru ARN*r* *18 S* și *28* S. S-a constatat că prezența ARN 5 *S* în subunitatea mare a ribozomului este esențială în funcționarea normală a ribozomului în sinteza proteinică.

ARN*r* din cloroplaste și mitocondrii prezintă greutăți moleculare mai mici decît moleculele corespunzătoare din citoplasmă.

Nu se cunoaște deocamdată care este funcția particulară a ARN*r*. Se admite că bazele neîmperecheate din ARN*r* ar participa, într-un fel sau altul (posibil tot pe principiul complementarității și formării de punți labile de hidrogen) la interacțiunea cu celelalte categorii de ARN celular spre a decodifica mesajul genetic purtat de ARN*m*. Are loc o aliniere corectă a diferitelor tipuri de ARN celular cerută de o fidelă traducere a informației genetice într-o secvență corectă de aminoacizi pentru sinteza unui polipeptid normal. Un rol principal în realizarea acestei alinieri revine ionilor de magneziu (Mg^{2+}) care joacă de asemenea un rol important în asamblarea unităților ribozomale.

Există diferențe semnificative în structura ribozomilor la procariote și eucariote, diferențe care formează ceea ce Wool (1979) a denumit *dilema centrală a ribozomului*. Astfel, ribozomii eucariotici sînt apreciabil mai mari decît cei procariotici, conținînd un număr mai mare de proteine ribozomale (cca 80, față de 53 la procariote) și au o moleculă în plus de ARN. Totodată moleculele de proteine ribozomale și de ARN*r* sînt mai mari la eucariote față de procariote. Diferența în dimensiune este un paradox deoarece ribozomii eucariotici îndeplinesc aceeași funcție generală — cantonarea sintezei proteinice ca și ribozomii procariotici. Se admite ca pentru a justifica aceste diferențe dimensionale la ribozomii eucariotici trebuie descoperite funcții noi. Unele proteine ribozomale suplimentare pot fi specializate pentru interacțiunea cu receptorii din reticulul endoplasmic numiți *ribophorine* I și II, altele pot fi implicate în reglarea mai complexă a traducerii ARN*m*. Necesitatea suplimentară pentru anumite proteine ribozomale, neimplicate în biosinteza proteinică poate fi determinată de particularitățile biogenezei organitului: proteinele ribozomale sînt sintetizate în citoplasmă și transportate în nucleol unde sînt asamblate în subunitățile ribozomale prin atașarea lor la precursorii ARN*r* pe cînd aceștia sînt încă transcriși de pe ADN ribozomal. *Pre*-ARN*r* va trebui prelucrat și ARN*r* 5 *S* transcris din alte situri în nucleu trebuie să fie încorporat în subunitatea mare ribozomală. Cele două subunități ribozomale trebuie transportate din nucleu în citoplasmă. În acest proces extrem de complicat de transport bidirecțional nucleu — citoplasmă ar putea fi implicate proteinele ribozomale suplimentare ale ribo-

zomului eucariot. Ele de asemenea pot participa la asamblarea subunităților ribozomale ca și în transportul lor spre citoplasmă.

Proteinele ribozomale ale organitelor celulei eucariote mitocondriale și cloroplastice sînt codificate în ADN nuclear și sintetizate pe ribozomi citoplasmatici. Din această cauză la eucariote cu mitocondrii și cloroplaste sînt sintetizate în citoplasmă circa 200 de proteine ribozomale care trebuie distribuite în nucleol, mitocondrii și cloroplaste. Cum se realizează această distribuție nu se cunoaște. S-ar putea ca toate aceste proteine să fie filtrate prin cele trei organite, fiecare reținînd grupul corect de proteine ribozomale. S-ar putea ca proteinele suplimentare ale ribozomilor eucariotici să condiționeze ele însele această distribuire. În sfîrșit, nu poate fi exclusă nici posibilitatea ca proteinele ribozomale suplimentare de la ribozomii eucariotici să nu aibă o funcție specială sau să nu îndeplinească nici o funcție. Există mutanți de *Bacillus subtilis* și *B. megaterium* rezistente la thiostrepton și care sînt lipsiți de proteina ribozomală *L 11*. Mutantul de la prima specie spre deosebire de acela de la a doua specie de *Bacillus* nu prezintă nici un fel de deficiență. Concluzia care se desprinde este că proteina *L 11* la *B. subtilis* nu îndeplinește vreo funcție ribozomală sau în sinteza proteinică, dar nu poate fi exclusă posibilitatea ca rolul său să fie preluat de alte proteine ribozomale prezente la acest mutant.

5. *ARN de transfer (ARNt)*. A mai fost numit și ARN solubil (ARN*s*), ARN *acceptor* de aminoacizi sau ARN *adaptor*. Sînt molecule adaptoare sau de racordare la care se atașează diferiți aminoacizi care sînt transferați la ribozomi în timpul biosintezei proteinice. Aceste molecule de racordare se atașează la rîndul lor în mod specific la grupările cetonice și aminice libere de pe monocatena ARN*m* pe principiul împerecherii complementare de baze azotate cu formarea unor punți temporare de hidrogen. ARN*t* joacă rol cheie în biosinteza proteinică.

Pentru fiecare aminoacid există cel puțin cîte o moleculă specifică, diferită de ARN*t*. Greutatea moleculară a ARN*t* este de circa 25.000 daltoni avînd o constantă de sedimentare de 4 *S*. Lungimea moleculei ARN*t* este de 73—90 nucleotide. Reprezintă 10—15% din cantitatea totală de ARN celular. Ca și ARN*r*, ARN*t* nefiind purtător de mesaj genetic are, spre deosebire de ARN*m* o durată de viață mare, prezentînd o stabilitate metabolică mare, diferitele molecule ARN*t* putînd fi reciclate de nenumărate ori. Capătul liber 3′ al monocatenei se

termină la toate tipurile de ARN*t* cu secvenţa CCA pe cînd la capătul liber 5′ se află secvenţa terminată în G. Moleculele ARN*t* prezintă o mare stabilitate metabolică care derivă tocmai din prezenţa guaninei (pG) la capătul 5′ al monocatenei sale. Aceasta face ca ARN*t* să nu fie supus aşa cum este supus ARN*m* digestiei enzimatice, guanina stabilind punţi de hidrogen cu baza opusă din tulpina dublu-catenară a structurii trifoliare a ARN*t*. ARN*t* conţine şi unele nucleotide neobişnuite precum acidul inosinic (I) care poartă purina hipoxantină şi care nu formează aceleaşi perechi de baze azotate ca cele formate de A şi G. Alte nucleotide neobişnuite aflate în ARN*t* sînt acidul 1-metilinosinic (I^m) acidul 1-metilguanilic (G^m) şi acidul N_1N-dimetilguanilic (G^m) la care, prezenţa grupărilor metil determină formarea de perechi cu oricare alte baze azotate. Tot ca bază neobişnuită intră în ARN*t* şi acidul pseudouridilic (Ψ) la care inelul pirimidilic uracil este ataşat la riboză nu prin azotul său N_1 ca în acidul uridilic normal ci prin carbonul său C—5. Acidul ribotimidilic (T) este de asemenea o ribonucleotidă neobişnuită ce intră în ARN*t* şi care este legată de convertirea uracilului în timină în urma unei metilări a uracilului la C 5. Mai există şi o altă bază neobişnuită în ARN*t* şi anume acidul dihidrouridilic (U^h) sau DHU) în care uracilul poartă hidrogen suplimentar la C 5 şi C 6. În realitate dihidrouracilul nu este o pirimidină deoarece legătura dintre C 5 şi C 6 nu este o punte dublă ci una simplă. Nucleotidele neobişnuite nu pot fi introduse în precursorul ARN*t* în timpul transcrierii prin nici un mecanism de împerechere de baze complementare. Ele apar în urma modificărilor posttaranscripţionale a nucleotidelor normale, deja prezente în pre-ARN*t*.

Prin plierea monocatenei rezultă regiuni dublu-catenare în zonele în care bazele azotate se împerechează complementar cu formarea de punţi de hidrogen. Din aranjamentul spaţial al regiunilor bicatenare şi al regiunilor monocatenare rezultă o structură secundară care este cunoscută ca modelul frunzei de trifoi (Fig. 30). Structura secundară bidimensională poate fi la rîndul ei supusă plierii spre a da o structură terţiară tridimensională caracteristică de forma literei T (Fig. 30c).

În structura unor tipuri de ARN*t* intră şi inosina (I) mai ales în secvenţa anticodonului pentru codonii serinei (UCU), leucinei (CUU), prolinei (CCC), argininei (CGC), izoleucinei (AUA) etc., în care inozina (I) intră în poziţia 3 antiparalelă (deci poziţia 1 în citire directă). Neputîndu-se împerechea, bazele metilate delimitează regiunile bicatenare ale monocatenei.

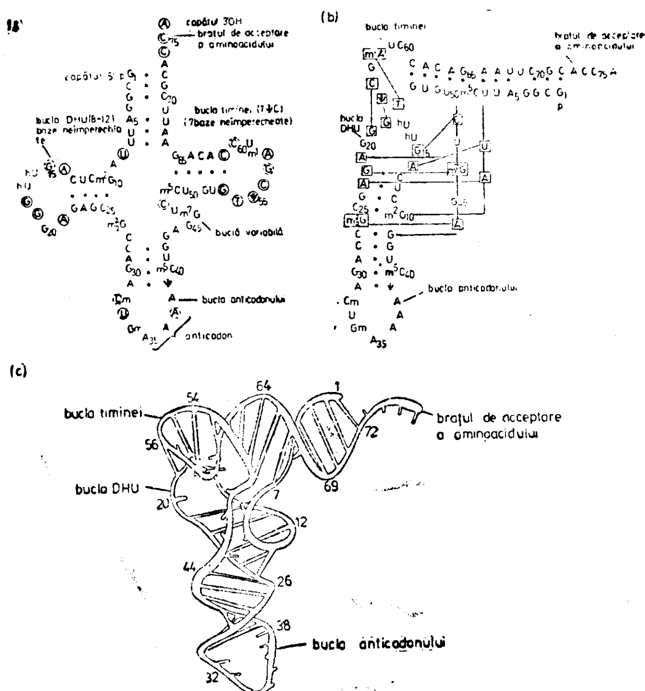


Fig. 30. Structura ARNt. (a). Secvența celor 76 nucleotide din macromolecula de ARNt pentru alanină de la drojdie prezentată în modelul bidimensional al frunzei de trifoi. Se indică cele patru bucle majore incluzînd și bucla anticodonului care are secvența A—A—A și care se potrivește prin complementaritate codonului din ARN*m* fenilalanină U—U—U. Bazele încercuite cu linii continui ocupă aceleași poziții în toate moleculele de ARN care au fost analizate pînă în prezent. Bazele încercuite cu linii întrerupte sînt diferite la alte tipuri de ARN*t*. Numerotarea bazelor începe de la capătul 5′. Nucleotidele neobișnuite găsite la ARN*t* sînt: *hU*=*DihU* = dihidrouridina, Ψ=pseudouridina, *mx* = nucleotide metilate și *T* = timina (un uracil metilat în poziția 5 în inelul pirimidinic). (b). Diagrama schematică care indică maniera în care $ARNt^{Fen}$ poate fi răsucit spre a produce unele dintre relațiile fizice observate între diferitele părți ale moleculei. Liniile subțiri indică punțile de hidrogen ce apar între baze în cadrul structurii terțiare pliate. (c). O reprezentare tridimensională a ARN*t* redată după studii de difracție în raze X.

Descifrarea secvenței de baze din structura primară monocatenară a ARN*t* pentru alanină la drojdie precum și a structurii sale secundare — configurația spațială cu regiuni monocatenare și bicatenare — au permis lui Holley și colaboratorilor săi să

elaboreze modelul frunzei de trifoi pentru această configurație spațială care s-a dovedit a fi valabil pentru toate tipurile de ARN*t*. Pentru această realizare Holley a fost distins cu premiul Nobel. Folosind datele de secvențiere a ARN*t* pentru alanină extras de la drojdie, Khorana și colab. au realizat pe cale chimică, prima sinteză a unei gene, gena care dirijează sinteza ARN*t* pentru alanină.

ARN*t* se sintetizează pe matriță de ADN prin intervenția ARN-*polimerazei* și apare mai întîi ca moleculă precursoare care, după transcriere, este supusă prelucrărilor posttranscripționale. Moleculele precursoare la ARN*t* ca și la ARN*m* prezintă la capătul 5′ o secvență suplimentară numită secvența conducătoare sau din cap (*leader*) iar la capătul 3′ altă secvență suplimentară numită secvența din coadă (*trailer*). De asemenea, precursorul ARN*t* prezintă secvențe interpuse în cadrul secvenței care va constitui secvența ARN*t* matur funcțional. Printre prelucrările posttranscripționale unele determină excizia unor nucleotide din *pre*-ARN*t* sub acțiunea enzimei RN-*ază P* (P de la precursoare) pe cînd altele determină adiția la capătul 3′ al monocatenei a secvenței 5′ pC_pC_p *A* 3′, implicată în aminoacilarea ARN*t*. Implicarea secvenței CCA în aminoacilarea ARN*t* (atașarea aminoacidului activat — vezi sinteza proteinică) a fost dovedită în experiențe de îndepărtare a acesteia folosind fosfodiesteraza din venin de șarpe care acționează numai asupra acestui capăt monocatenar al moleculei ARN*t*. ARN*t* lipsit de secvența CCA de la capătul 3′ pierde capacitatea de a accepta aminoacizi. Capacitatea acceptoare pierdută a unui ARN*t* tratat cu fosfodiesterază poate fi redobîndită dacă acest ARN*t* deficient este pus într-un amestec de reacție care conține o enzimă specială (terminaltransferaza) ce are capacitatea de a adăuga nucleotide terminale fără a recurge la împerecherea complementară de baze cu o matriță polinucleotidică și substraturile sale CTP și ATP. Alte prelucrări posttranscripționale sînt cele care realizează modificarea chimică a unora dintre nucleotidele rămase. Printre modificările chimice mai importante sînt metilarea și formarea pseudouridinei.

Modificările chimice ale nucleotidelor obișnuite (incluse în catena *pre*-ARN*t* în timpul transcrierii sale de pe matrița ADN) care duc la convertirea lor în nucleotide neobișnuite sînt catalizate de enzime speciale existente atît la procariote cît și la eucariote. O astfel de enzimă convertește grupul NH_2 de pe carbonul 2 al acidului adenilic din pre-ARN*t* în grupul OH

creind astfel un rest inozină la unele situri ale catenei *pre-ARNt*. Alte enzime transferă grupul metil (enzimele se numesc în consecință metilaze) la hipoxantină, guanină sau uracil din *pre*-ARNt spre a da I^m, G^m, G^{m} sau T. În sfîrșit, alte enzime rearanjează legăturile dintre inelul pirimidinic și riboză spre a converti uracilul în pseudouracil sau spre a hidrogena inelul, convertind uracilul în dihidrouridină. Asemenea prelucrări posttranscripționale au putut fi studiate în cazul microinjecției nucleului de drojdie de bere în ovocita de broască.

Prelucrările posttranscripționale implică în cazul precursorului ARNt (*pre*-ARNt) pentru tirozină de la drojdie, eliminarea secvențelor interpuse din *pre*-ARNt (descrisă prima dată de către Goodman și colaboratorii în 1977), excizia secvențelor suplimentare 5′ *leader* și 3′ *trailer*, adăugarea secvenței CCA la capătul 3′. Toate aceste prelucrări au loc în nucleu. Tot în nucleu mai sînt modificate, în cazul ARNt pentru tirozină de la drojdie sintetizat în ovocite de broască microinjectate cu nucleu de drojdie, cel puțin șapte ribonucleotide înainte ca ARNt să fie transportat din nucleu în citoplasmă (Melton și colab., 1980). Aceste modificări ce duc la formarea în *pre*-ARNt a 5 metil-citozinei (m^5C), 1 metil-adenozina (m^1A), pseudouridina (Ψ) și dihidrouridina (DHU) apar în nucleu. O singură modificare apare în citoplasmă și anume a guaninei. S-a constatat că modificările apar într-o ordine precisă, strictă, care se corelează cu schimbările din dimensiunea precursorului ARNt determinate de eliminarea secvențelor *leader* și *trailer*. Astfel, de îndată ce secvența *leader* este eliminată și este adăugat 3′CCA, U din regiunea anticodonului este modificat în pseudouridină (Ψ).

Determinarea secvenței ADN corespunzînd la 4 din cele 8 gene ARNt pentru tirozină (*t* ADN*tyr*) de la *Saccharomyces cerevisiae* a condus la constatarea că aceste gene ARNt pentru tirozină conțin o secvență interpusă de 14 baze adiacente anticodonului care nu este prezentă în ARNt matur și deci ea este eliminată în cadrul prelucrărilor posttranscripționale.

Maturarea precursorilor ARNt divizată în mod convențional în două procese separate — reducerea dimensiunii și modificarea de baze reprezintă un proces unic, căci cele două aspecte sînt intim legate, desfășurîndu-se concertrant. Succesiunea ordonată a etapelor de prelucrare posttranscripțională a ARN în general și a ARNt în special, sugerează că enzimele de maturație care condiționează transformarea *pre*-ARN în ARN matur au capacitatea, unele de a recunoaște precursori cu sec-

vențe 5′ *leader*, iar altele de a recunoaște și accepta ca substrat *pre*-ARN fără această secvență 5′ leader. Este posibil ca în această capacitate de recunoaștere să joace un anumit rol și secvențele interpuse. Ar trebui să fie un număr de cel puțin 61 tipuri de ARN*t* care să traducă mesajul genetic (vezi codul genetic) și care ar corespunde celor 61 codoni sens din ARN*m*. La *E. coli* sînt 30—40 tipuri diferite de ARN*t* specificați de gene limitat redundante. La eucariote, genele pentru ARN*t* sînt înalt redundante.

Teoretic ar trebui să fie un număr de 64 tipuri diferite de ARN*t* care să traducă mesajul genetic (vezi codul genetic). Au fost izolate în stare pură aproape toate tipurile de ARN*t*, iar la peste 20 dintre ele a fost stabilită secvența de nucleotide a monocatenei (structura primară). Genele pentru ARN*t* ca și cele ribozomale sînt prezente atît la procariote cît și la eucariote în copii multiple (40—80 la procariote, 320—1400 la eucariote), în unele cazuri fiind distribuite grupat în genom formînd așa-numiții *clusteri*. Fiecare aminoacid are cel puțin un ARN*t* specific care intervine în activarea sa în cadrul biosintezei proteinice. Uneori, același aminoacid poate fi activat de două tipuri diferite de ARN*t* care s-au numit ARN*t* *isoacceptori*. Specificarea unui aceluiași aminoacid de două tipuri de ARN*t* ar fi o măsură elaborată în cursul evoluției de a asigura realizarea biosintezei proteinice în condițiile în care la nivelul unuia dintre ARN*t* isoacceptori s-a manifestat fenomenul mutagen.

Fiecare moleculă de ARN*t* prezintă regiuni specifice de interacțiune cu alte molecule, regiuni, în care nu apar împerecheri de baze prezentîndu-se ca bucle la nivelul cărora bazele sînt expuse avînd posibilitatea interacțiunii cu alte elemente. Astfel, secvența CCA de la capătul 3′ al moleculei ARN*t* este implicată în atașarea aminoacidului corespunzător la molecula ARN*t*, în vederea transportului său. Fiind aceeași la toate moleculele ARN*t*, secvența CCA nu este implicată în specificitatea atașării aminoacidului la ARN*t*.

Molecula ARN*t* prezintă însă o regiune care conferă specificitate ARN*t* prin care acesta recunoaște în mod specific un aminoacid dat. Această regiune este variabilă la diferitele tipuri de ARN*t*. De asemenea, molecula ARN*t* mai prezintă o regiune de recunoaștere a ribozomului reprezentată de prima buclă din modelul frunzei de trifoi, alcătuită din 7 baze neîmperecheate, numită bucla TΨC, precum și o regiune de recunoaștere a codonului din ARN*m*, regiune care s-a numit

anticodon sau *nodoc* (opusul lui codon) şi care este formată, ca şi codonul din trei baze azotate (tripleta). Ea se află în bucla anticodonului. Regiunea anticodonului este specifică fiecărui tip de ARN*t* şi ea condiţionează recunoaşterea corectă a codonului din ARN*m* corespunzător aminoacidului purtat de ARN*t* şi care este specificat (codificat) de către codonul din ARN*m*. Între prima buclă şi bucla anticodonului se află o buclă mică numită „ciot".

Recunoaşterea codonului de către anticodon se bazează pe principiul complementarităţii bazelor azotate de tip (A U A —
1 2 3
codon — U A U anticodon; C G A codon — G C U — antico-
3 2 1   1 2 3   3 2 1
don etc.) care se asociază temporar prin formarea unor punţi de hidrogen. Codonul şi anticodonul sînt orientate antiparalel (5'→3' codonul, 3'→5' anticodonul).

Împerecherea corectă codon-anticodon condiţionează plasarea în catena polipeptidică ce se sintetizează a unui aminoacid dat la locul corespunzător, sintetizîndu-se astfel o proteină normală structural şi funcţional.

Dar, potrivit ipotezei oscilării (*wobble*) elaborată de Crick în 1960, uneori un anumit tip de ARN*t* are capacitatea de a recunoaşte prin anticodonul său mai mulţi codoni (triplete) care însă se deosebesc doar prin cea de-a treia bază. Înseamnă că în cadrul interrelaţiei codon-anticodon, esenţială în descifrarea, decodificarea (traducerea) mesajului genetic transcris în ARN*m*, primele două perechi de baze prezintă o mai mare specificitate a împerecherii pe cînd cea de a treia capătă caracter oscilant. Astfel U aflat în conformitate cu antiparalelismul împerecherilor de baze pe primul loc în secvenţa anticodonului (altfel, ea ocupă tot locul trei în acesta dacă considerăm orientarea generală de la stînga la dreapta) poate să se împerecheze cu A dar şi cu G aflate în codonul ARN*m* ca cea de a treia bază.

Tot astfel G din anticodon poate recunoaşte, în aceleaşi condiţii tipologice atît C cît şi U, iar hipoxantina poate recunoaşte U, C şi A aflate în poziţia a treia în codon. Nu acelaşi lucru este pentru C şi A aflate în poziţia ultimă (considerînd sensul general stînga→dreapta) în anticodon. Acestea nu pot recunoaşte şi nu se împerechează decît cu bazele complementare corespunzătoare aflate în a treia poziţie în codon şi anume G şi U.

Cea de a patra buclă din modelul frunzei de trifoi conține 6—12 baze neîmperecheate. Ea s-a numit bucla dihidrouracilului, fiind implicată în legarea ARN*t* la *aminoacilsintetază,* enzimă activatoare specifică pentru fiecare aminoacid.

Inițierea tuturor catenelor polipeptidice (traducerii mesajului genetic) se realizează prin intervenția așa-numitului ARN*t* *inițiator*. Acesta este ARN*t* ce transferă N-formilmetionina ($ARNt^{fMet}$) la bacterii, virusuri, mitocondrii și cloroplaste și ARN*t* ce transferă metionina ($ARNt^{Met}$) la eucariote.

Funcția ARN*t* este în esență legată de decodificarea mesajului genetic. Dar ARN*t* mai poate juca rol și în alte procese celulare, mai ales la bacterii cum ar fi reglarea activității genelor (operoni) care dirijează sinteza unor aminoacizi, transportul unor aminoacizi necesari formării punților interpeptidice din pereții celulari ai bacteriilor, sinteza aminoacilfosfatidilglicerolului, adiția terminală a resturilor aminoacizi la proteine etc.

În cazul în care genele pentru ARN*t* suferă mutație se sintetizează ARN*t* la care este alterată specificitatea de recunoaștere de către anticodon a codonului corespunzător datorită modificărilor ce apar în bucla anticodonului sau adiacent ei. Un asemenea ARN*t* va putea să recunoască codoni *nonsens* sau *missens,* care condiționează fie terminarea lanțului polipeptidic în primul caz, fie includerea în lanțul polipeptidic a unui aminoacid necorespunzător datorită modificării prin substituție a secvenței de bază în cel de-al doilea caz.

ARN nuclear heterogen și ARN cromozomal.

La eucariote se mai descriu și alte două tipuri de ARN celular. Este vorba de ARN *nuclear heterogen* și ARN *cromozomal.*

6. *ARN nuclear heterogen* (*ARNhn*) reprezintă o clasă de molecule ARN cu greutate moleculară variabilă între 10^5 și 2×10^7 daltoni cu durata de viață scurtă (5—10 minute) fiind instabil metabolic. ARN*hn* reprezintă cca 3% din totalul ARN celular. Fiind sintetizat pe matrița ADN are o compoziție de baze complementară ADN. Are un conținut G + C de cca 40—45% cu mult mai mic decît cel al ARN*r* care este de cca 70%. Este localizat în afara nucleolului.

Din ARN*hn* derivă, în urma prelucrărilor posttranscripționale ARN*m,* din care cauză ARN*hn* s-a mai numit ARN *premesager* sau *pre*-ARN*m*. Partea din ARN*hn* care nu reprezintă ARN*m* este transcrisă de pe ADN care prezintă secvențe repetate de nucleotide și care se pare că sînt implicate în me-

canisme de reglare. Această parte a ARN*hn* poate prezenta o conformație caracteristică sub formă de ac de păr numită structură *hairpin* și care se formează prin împerecheri intracatenare de baze complementare.

7. *ARN cromozomal (ARNc)*. Este un tip de ARN complementar unor secvențe specifice din ADN cromozomal al eucariotelor. O parte din acest ARNc reprezintă molecule precursoare ale ARN*m*, ARN*r*, și ARN*t*. ARN cromozomal, pe de altă parte se crede că reprezintă o categorie de ARN celular legată de interacțiunea ADN-proteine căreia îi conferă specificitate de secvență, acest tip de ARN legîndu-se covalent la proteinele cromozomale histone.

Greutatea moleculară a ARNc este mai mică decît cea a ARN*t* căci cuprinde doar 30 pînă la 50 nucleotide. Conține pînă la 27% dihidrouracil. Nu se știe încă dacă ARNc este într-adevăr un tip aparte de ARN celular sau reprezintă un produs de degradare a ARN*hn*. Sînt date după care ARNc intervine într-un mod specific în reglarea activității genice la eucariote, avînd efect derepresor asupra genelor represate prin complexarea ADN cu histonele.

8. *ARN viral*. La unii fagi ca și la unele virusuri vegetale și animale miezul de acid nucleic este reprezentat de ARN, purtător în acest caz de informație genetică primară din care cauză se mai numește și ARN *genetic*. ARN *viral* poate fi monocatenar (bacteriofagii F_2 și R_{17}, virusul mozeicului tutunului, virusul gripal și polio). Reovirusurile au ARN bicatenar. Moleculele ARN sînt liniare, niciodată circulare.

ARN *viral* îndeplinește atît rol de matriță pentru replicarea sa în vederea multiplicării particulelor virale cît și rol de ARN *mesager* pentru sinteza de proteine virale specifice. Genomul viral ARN îndeplinește deci o funcție dublă, genomul și transcriptul fiind într-un anume sens unul și același lucru și aceeași enzimă numită *replicază* sau *transcriptază,* de fapt o ARN polimerază servind atît funcția de replicare cît și funcția de transcriere.

Cel mai bine studiat este ARN al fagilor Qβ și R_{17} la care s-a realizat secvențierea nucleotidelor în cea mai mare parte. Astfel cromozomul fagului R_{17} alcătuit dintr-o monocatenă ARN conține cca 3510 nucleotide, purtînd informația pentru sinteza a 3 proteine și rămînînd încă 580 nucleotide, primele 100 nucleotide de la capătul 5′ nefiind niciodată traduse în proteină ca dealtfel nici cele 50 nucleotide care preced capătul 3′. Capătul 3′ al catenei conține secvența 5′... CCA CCCA—3′ și se

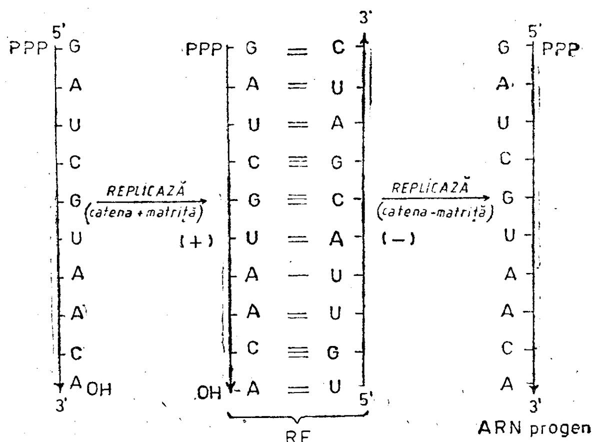


Fig. 31. **Replicarea ARN viral. RF — formă replicativă dublu-catenară.**

admite că această secvență este recunoscută specific de către enzima replicază. Pe parcursul secvenței ARN apar posibilități de împerecheri complementare intracatenare cu formare de structuri buclate de tip *hairpin,* structuri implicate în conferirea de stabilitate monocatenei ARN în timpul infecției, în împachetarea sa într-o formă mai compactă în capsida fagică.

În vederea sintezei proteinelor virale moleculele de ARN viral, acționînd ca ARN*m* se atașează la ribozomii celulei gazdă formînd poliribozomi.

Imediat după injectarea ARN viral în celula gazdă și legarea sa de ribozomii celulei gazdă este sintetizată enzima ARN *sintetază* (ARN-*replicază*) care catalizează formarea unei catene complementare realizînd astfel replicarea ARN viral (Fig. 31). Dacă se consideră catena inițială, care pătrunde în celula gazdei drept catena „+“ ea servește ca matriță pentru sinteza catenei complementare „—“ pe principiul împerecherii de baze complementare cu formarea de punți de hidrogen, realizîndu-se pentru un anumit timp o structură bicatenară ARN numită *formă replicativă* (RF). Au loc apoi multe runde de replicare ale formei replicative bicatenare. Unele din catenele + nou sintetizate acționează ca ARN*m* dictînd sinteza de replicază și proteine ale capsidei. Alte catene +, dar nu este exclus ca și unele din acelea care au participat la sinteza pro-

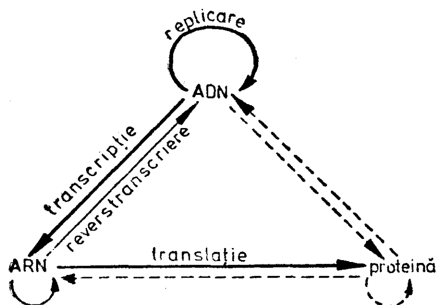


Fig. 32. Dogma centrală revizuită a biologiei moleculare. Diagrama redă relațiile de transfer de informație dintre macromoleculele informaționale: liniile groase — relații dovedite pînă în prezent; linia subțire continuă — mecanismul special de transfer de informație de la ARN la ADN (reverstranscriere) care are loc în celulele infectate cu oncovirusuri; liniile întrerupte — transfer de informație nedovedit pînă în prezent.

teinică, devin împachetate în capsida proteinică a noilor particule fagice, constituind cromozomul viral.

Iată deci că avem aici de-a face cu o dualitate în care aceeași moleculă de ARN viral poate funcționa atît ca material genetic cît și ca ARN*m*.

9. *Reverstranscrierea.* Pînă acum am analizat transferul informației genetice de la ADN la ADN în procesul replicării ADN de la ADN la ARN în procesul transcrierii și de la ARN la ARN în replicarea ARN viral.

Pînă în anul 1970 a dăinuit ideea, cristalizată în așa-numita *dogmă a biologiei moleculare* (Fig. 32), potrivit căreia transmiterea informației ereditare se face unidirecțional în sensul ADN→ARN→proteine. În anul 1970 Temin și Mizutani pe de o parte și Baltimore pe de alta au descris o ADN *polimerază* dependentă de ARN izolată din *virionii* virusurilor oncogene ARN (ribovirusuri oncogene din familia *Retroviridae*) și din celule infectate cu asemenea virusuri ca și din celule transformate malign. Această enzimă are capacitatea de a transcrie ARN natural sau sintetic și de a sintetiza astfel, folosind ca matriță ARN, o copie complementară — ADNc. Este deci o violare a dogmei centrale a biologiei moleculare căci în acest caz enzima ADN-*polimerază,* dependentă de ARN, condiționează transferul informației genetice de la ARN la ADN. Din această cauză a fost numită *invertază, revertază* sau *reverstranscriptază* iar procesul sintezei unei copii ADN pe matriță ARN s-a numit inverstranscriere sau *reverstranscriere.*

Reverstranscriptaza folosește ca substrat dezoxiribonucleotid-trifosfați, este dependentă de o matriță ARN și pentru reacția de polimerizare necesită un ARN *primer* cu rol de a iniția sinteza catenei ADN la care se leagă printr-o legătură

covalentă fosfodiesterică. De asemenea enzima necesită pentru reacția reverstranscrierii ioni bivalenți de Mg și Mn. După adăugarea primului dezoxiribonucleotid la grupul 3'—OH al primerului ARN, reacția de reverstranscriere se desfășoară prin adăugarea succesivă de dezoxiribonucleotide, care se împerechează cu bazele complementare din matrița ARN, între dezoxiribonucleotide stabilindu-se legături covalente fosfodiesterice. Monocatena ADN astfel sintetizată, copie a matriței ARN, formează cu aceasta, prin intermediul punților de hidrogen dintre bazele complementare o structură bicatenară hibridă ARN-ADN, Intervine se pare o *ribonuclează H* care hidrolizează ARN din hibrid astfel că monocatena ADN poate servi ca matriță pentru sinteza unei catene complementare. Rezultă un ADN bicatenar purtător de informație genetică virală și care se poate integra în cromozomul celulei gazdă sub forma a ceea ce a fost numit *provirus*. Fără a duce la liza celulei infectate, pe calea reverstranscrierii, celula gazdă este însă transformată malign. La un moment dat, sub influența diferiților factori mutageni, fizici, chimici sau biologici (infecția cu un alt virus) provirusul ADN se desprinde din cromozomul gazdă și poate transcrie molecule de ARN viral, asigurînd astfel multiplicarea virusului oncogen.

ADN proviral se integrează în cromozomul gazdă în regiuni omoloage, integrarea fiind condiționată de o enzimă numită *integrază* pe cînd în excizia sa pe lîngă integrază intervine și o *excizionază*. Integrarea și excizia ADN proviral sînt în esență fenomene recombinatorii de tip *rupere-reunire* (vezi recombinarea genetică).

Virusurile oncogene prezintă un genom reprezentat de ARN monocatenar avînd o constantă de sedimentare de 78 S, care cuprinde patru gene simbolizate *gag, onc, inv* și *pol*.

Gena *gag* specifică proteinele virale interne avînd ca produs primar o proteină cu masa moleculară de 76 000 daltoni. Gena *onc* specifică o proteină implicată în inducerea transformării maligne a celulelor în creștere. Gena *inv* este legată de sinteza glicoproteinei de la suprafața învelișului virionului, iar gena *pol* specifică sinteza inverstranscriptazei (reverstranscriptazei).

În 1969, Huebner și Todaro au elaborat ipoteza oncogenei potrivit căreia toate celulele conțin în ADN o *virogenă,* adică o genă care conține informația genetică a unui virus incluzînd și aceea pentru transformarea malignă a celulei gazdă, adică

oncogena. Virogena este replicată și transmisă odată cu ADN gazdă de-a lungul generațiilor celulare. În mod normal celula a elaborat mecanisme de represie a virogenei. Cînd mecanismul de represie este alterat virogena se exprimă și duce prin activitatea oncogenei la transformarea malignă a celulei. Alterarea mecanismului de represie apare în urma acțiunii diferiților agenți fizici, chimici sau biologici.

Desigur virusurile oncogene pot fi ribovirusuri (ARN) sau dezoxiribovirusuri (virusuri ADN). Reverstranscrierea este însă specifică ribovirusurilor oncogene.

Capitolul III

ORGANIZAREA MATERIALULUI EREDITAR

Sistemele biologice cuprind două tipuri fundamentale de organizare și anume *organizarea virală* și *organizarea celulară*. La rîndul său organizarea celulară cuprinde două tipuri divergente de organizare: organizarea procariotă și organizarea eucariotă, precum și un tip intermediar, *organizarea mezocariotă* (Gavrilă, 1978).

1. ORGANIZAREA VIRALĂ

Asupra conceptului de virus a fost elaborat recent un excelent studiu critic (Zarnea și Herlea, 1974).

Statutul particular al sistemului viral poate fi desprins de expresia aforistică a lui Lwoff care în 1957 afirmă că „virusurile pot fi considerate ca virusuri, din cauză că virusurile sînt virusuri". Virusurile se caracterizează prin existența în structura lor a unui singur tip de acid nucleic (fie ADN, fie ARN, niciodată ambele tipuri de acid nucleic). Virusurile nu cresc, nu se divid și nu posedă aparat enzimatic pentru producere de energie. Prin aceasta virusurile se deosebesc esențial de toate celelalte sisteme biologice existente actualmente în natură. Dar virusurile pot fi considerate totuși sisteme biologice prin faptul că ele prezintă caracteristici structurale și dimensiuni constante, pot suferi mutații și recombinare genetică și prezintă o ontogeneză precisă în care pe seama materialului biologic al celulei gazdă, materialul lor genetic dirijează formarea noilor particule virale, asigurînd astfel perpetuarea lor.

Virusurile au organizare acelulară. Particula virală com-

pletă numită *virion* sau virusul infecțios matur reprezintă o unitate de structură și funcție alcătuit dintr-un înveliș proteinic — *capsida* și un miez de acid nucleic. Miezul de acid nucleic este reprezentat de ADN la *dezoxiribovirusuri* și de ARN la *ribovirusuri*. Acizii nucleici virali nu sînt asociați cu proteine cu excepția unor cazuri în care se descrie existența în interiorul capsidei a unei proteine implicată în împachetarea (supraspiralizarea) acidului nucleic viral obligat să fie cantonat într-un spațiu foarte restrîns. Alte tipuri de proteine virale „interne" au rol enzimatic (*replicaza* sau *reverstranscriptaza* de exemplu).

Miezul de acid nucleic viral se mai numește *cromozom viral*. Virusurile sînt paraziți obligați de nivel genetic, deoarece virusurile, nu se reproduc de sine stătător, ci ele se reproduc pe seama componentelor celulei gazdă după planurile arhitecturale înscrise în informația ereditară virală depozitată în miezul de acid nucleic ADN sau ARN.

Datorită acestui fapt marea majoritate a virusurilor manifestă o înaltă și strictă specificitate de gazdă: un virus ce infectează *Escherichia coli* bunăoară, în mod normal nu va putea infecta o altă specie de bacterie, ba mai mult prezintă preferință pentru o anumită tulpină de *E. coli*. O singură excepție se impune a fi amintită. Este vorba de virusul *PWT* care infectează peste 40 de specii diferite de plante și chiar o insectă.

În afară de virion, virusul se mai poate afla sub formă de virus vegetativ corespunzînd cromozomului viral aflat liber în citoplasma celulei gazdă în timpul multiplicării sale sau sub formă de provirus cînd este integrat în cromozomul gazdă. În cazul dezoxiribovirusurilor, ADN poate fi dublu-catenar (liniar sau circular), sau monocatenar, circular. Acesta din urmă devine dublu-catenar în timpul replicării.

La ribovirusuri precum bacteriofagii *Qβ*, R_{17} *și* f_2, *VMT*, unele virusuri animale (influenza și al poliomelitei) ARN este monocatenar și devine dublu-catenar în timpul replicării. Reovirusul are un ARN dublu-catenar chiar atunci cînd este în stare de virion. Virusurile plantelor au în general un ARN dublu-catenar. La reovirus și alte virusuri animale genomul viral este segmentat adică ARN este reprezentat prin mai multe piese de *ARN bicatenar*. Genomul ARN al virusului gripal este discontinuu. El este monocatenar și format din 9 fragmente avînd o greutate moleculară cuprinsă între 10^5 și 10^6 daltoni realizînd o masă moleculară de $5,5 \times 10^6$ daltoni.

Virusurile gripale, paragripale şi rabdovirusurile se numesc virusuri cu catenă negativă deoarece ARN-ul lor nu are funcţie mesageră, şi pătrunzînd în celula gazdă, nu poate induce sinteza proteinelor virale specifice, din asemenea virusuri neputîndu-se extrage ARN viral infectant. În particulele virale ale acestor virusuri există enzima *transcriptază* care asigură transcrierea unei catene „+“ pe catena iniţială „—“. Transcrierea şi replicarea ar putea fi realizată de aceeaşi enzimă ARN transcriptază, sau enzima de transcriere este modificată prin adiţia unei proteine din celula gazdă astfel că ea devine o replicază.

Dimensiunea genomului viral variază între 3000 nucleotide şi peste 10 000 nucleotide, codificînd între 3 şi 10 proteine cu o secvenţă de cca 140—160 aminoacizi. Bacteriofagii ARN reprezintă unele dintre cele mai mici virusuri avînd cca 3300 nucleotide care corespund la 3 gene principale, două specificînd proteine structurale ale virusului iar a treia specificînd ARN-sintetaza.

Adenovirusurile mai mici prezintă o macromoleculă de ADN sub formă circulară atît la nivelul virionului cît şi în forma sa replicativă, pe cînd în cele mari, la nivelul virionului, ADN se prezintă ca o moleculă filamentoasă lungă de 6 μm la fagul φ_{29} ce infectează bacteria Bacillus subtilis şi de 47—52 μm la fagii de tip T_2 şi T_4 ai bacteriei *E. coli*. Virusul variolei aviare are o moleculă de ADN lungă de 93 μm.

Fagul λ al bacteriei *E. coli* are o moleculă de ADN lungă de 16 μm şi care prezintă la capete prelungiri monocatenare din care cauză aceste capete sînt „lipicioase“ sau „adezive“, adică au secvenţe complementare pe seama cărora molecula bicatenară liniară de ADN se circularizează *in vitro* ca şi în timpul cînd se află în celula bacteriană.

Şi fagii T_2, T_4, T_3 *şi* T_7 prezintă secvenţe terminale repetate în moleculele liniare dublu-catenare de ADN dar ele se află la nivelul unor regiuni dublu-catenare, neputîndu-se realiza circularizarea.

Forma circulară protejează macromolecula ADN de atacul exonucleazelor.

De regulă însă la nivelul ADN viral nu se află secvente repetate de baze.

Se constată că virusurile care au acid nucleic reprezentat de o moleculă monocatenară în virion aceasta devine dublucatenară în timpul replicării. Monocatena reprezintă mesagerul la fagi precum Qβ şi f_2 care, pătrunzînd în celula gazdă poate fi

direct tradusă de mașinăria de sinteză proteinică a celulei gazdă. În alte cazuri, catena care pătrunde reprezintă complementul mesajului, așa cum este cazul lui φ *X 174*. În acest caz, replicarea monocatenei este primul eveniment și numai după aceasta aparatul genetic este disponibil pentru transcriere.

În concluzie se poate spune că informația genetică a virusurilor se află codificată în cromozomul viral care este reprezentat fie de ADN, fie de ARN și care se află sub formă de molecule liniare sau circulare bicatenare sau monocatenare. Moleculele monocatenare de ADN sau de ARN capătă în timpul replicării formă bicatenară, reprezentînd intermediari replicativi sau forme replicative.

2. ORGANIZAREA CELULARĂ

Toate sistemele biologice cu excepția virusurilor prezintă organizare celulară. Organizarea celulară a reprezentat o etapă esențială în organizarea și evoluția materiei vii care a oferit enorme posibilități și perspective evolutive. Deosebirea principală dintre virusuri și celule constă în faptul că niciodată o particulă virală nu va putea da naștere direct la alte două particule virale prin diviziune. În cazul celulelor, oricît de simple ar fi ele, chiar aflate la limita superioară dimensională a particulelor virale, cum sînt microplasmele și ricketiile, multiplicarea presupune diviziunea unei celule preexistente prin care rezultă două celule fiice identice. La baza multiplicării celulare stă o fină coordonare între replicarea ADN și distribuția produșilor de replicare în celulele fiice prin intervenția unor mecanisme specializate și extrem de diversificate.

Toate celulele au de asemenea ambele tipuri de acizi nucleici și un sistem propriu de sinteză proteinică.

În cadrul organizării celulare se deosebesc două tipuri cardinale de organizare genetică — procariot și eucariot și un tip intermediar — mezocariot.

2.1. ORGANIZAREA PROCARIOTĂ

Acest tip de organizare caracterizează bacteriile, actinomicetele și algele albastre-verzi numite încă cianobacterii, prezentînd toate atributele sistemului biologic celular, inclusiv auto-

reproducerea şi morfogeneza autonomă. Materialul lor ereditar este reprezentat de o moleculă circulară dublu-catenară de ADN care se mai numeşte cromozom bacterian. Corespondentul morfologic al cromozomului circular bacterian este nucleoidul bacterian care prezintă la nivel ultrastructural ca şi genoforul algelor albastre-verzi fibrile fine de ADN care au un diametru de 25 Å (Gavrilă şi Tăcină, 1978).

Nucleoidul bacterian nu este separat faţă de citoplasmă, de către o structură membranară, astfel că aceste organisme nu au un nucleu adevărat. Materialul genetic nu este închis într-un spaţiu genetic definit, astfel că raporturile sale cu citoplasma sînt directe. La procariote relaţia ADN-cromozom este de totală omologie. Cromozomul bacterian cuprinde un set complet de determinanţi genetici (gene) ai tuturor caracterelor unei celule bacteriene, pentru metabolism energetic, biosinteze celulare, creştere şi diviziune ca şi pentru reglarea activităţilor intracelulare. ADN bacterian nu se asociază de regulă cu proteine bazice histonice. Date recente indică prezenţa la bacteria E. coli şi la cianobacteriile *Anabaena* şi *Aphanocapsa*, asociate la ADN, a unor proteine bazice de tip histonă cu greutate moleculară mică de 10.000 daltoni. Structura superspiralizată a ADN bacterian este menţinută de către ARN.

Cromozomul circular bacterian reprezintă suportul fizic al unicului grup de înlănţuire a genelor, toate genele bacteriene fiind transmise în bloc la descendenţi. El reprezintă cea mai mare moleculă descrisă pînă în prezent într-un sistem biologic cuprinzînd un număr de cca 2000—3000 de gene. Are un perimetru de 1400 µm. Circularitatea cromozomului bacterian îl protejează faţă de acţiunea depolimerizatoare a unor enzime precum dezoxiribonucleaza. Date asupra circularităţii cromozomului bacterian au fost obţinute prin urmărirea procesului de conjugare bacteriană. S-a constatat astfel că în cadrul acestui proces transferul de gene de la celula donor la celula receptor se face cu o secvenţialitate precisă şi determinată în timp (Jacob şi Wollman, 1961). Ulterior Cairns (1963) aduce dovezi concludente electronomicroscopice şi autoradiografice care probează circularitatea cromozomului bacterian. Toate bacteriile, cu o posibilă excepţie a bacteriei *Pseudomonas*, prezintă cromozom circular. Se cunoaşte încă puţin despre organizarea unor asemenea inele de peste 1000 µm lungime, aflate în celule a căror lungime nu depăşeşte 1—2 µm. Cromozomul bacterian prezintă un punct de ataşare pe membrana celulară, iar ataşarea aceasta reclamă sinteză proteinică. Sînt date după care

situl de atașare la membrana celulară corespunde unei regiuni din cromozomul bacterian bogată în secvențe A—T. De regulă fiecare celulă bacteriană are un singur cromozom dar în cazurile cînd replicarea cromozomului nu este urmată de diviziunea celulei pot apare 2—4 cromozomi. Dar acești cromozomi multipli nu aduc o informație genetică suplimentară, ei reprezentînd copii identice ale cromozomului original. Condiția normală a celulei bacteriene este haploidia, căci ea prezintă un singur set de determinați ereditari (gene).

În afara cromozomului circular — suportul grupului principal de gene în citoplasma celulei bacteriene se pot afla una sau mai multe structuri ereditare adiționale, extracromozomale (separate fizic de cromozomul principal) conținînd fiecare cca 0,5—2% din ADN total al celulei, care au fost numite *plasmide*. Ele se replică independent de cromozomul principal bacterian și sînt moștenite stabil. Ele sînt repliconi tipici. Plasmida (termen introdus de Lederberg, în 1952) reprezintă o moleculă circulară de ADN bicatenar, mult mai mică (1%) comparativ cu cea a cromozomului bacterian. Plasmida poartă 6—10 gene fiind de fapt un cromozom bacterian miniatural. Ca exemple de plasmide pot fi considerate *factorul de sex* (*F*), *factorul de rezistență la antibiotice* (*R*), *factorul colicinogenic* (*col*), *fagii temperați* cum ar fi *fagul* λ, care în stare de profag, se integrează în cromozomul gazdă tot astfel precum se poate integra și *factorul F*. În stare integrată asemenea structuri poartă numele de *episomi*.

Unele plasmide au fost numite *conjugoni* datorită proprietăților de a se comporta ca factori determinați ai conjugării, fiind transmisibile de la o celulă la alta în procesul conjugării.

Datorită transferului de plasmide de la o celulă la alta ca și a pierderii spontane a unora dintre ele, celula bacteriană se află într-o stare permanentă de variabilitate genotipică asigurîndu-se astfel o mai bună și nuanțată adaptare a acestora la mediul lor de viață. Dată fiind implicarea plasmidelor în fenomenele de rezistență la antibiotice, studiul lor a căpătat un mare impuls în ultimul timp cînd au apărut tulpini bacteriene multiplu rezistente. Dar în prezent studiul plasmidelor bacteriene este intensificat și prin aceea că aceste structuri moleculare s-au dovedit a fi excelenți cărăuși ai unor fragmente de ADN eucariot, reprezentînd un fel de „cal troian“ prin care

este introdus într-o celulă bacteriană un fragment de ADN purtător al unei gene eucariote. Este vorba de realizarea așa-zisului ADN recombinant.

2.2. ORGANIZAREA EUCARIOTĂ

Cu excepția bacteriilor, actinomicetelor și cianobacteriilor, toate sistemele biologice celulare au materialul ereditar închis într-un spațiu genetic — nucleul — delimitat de procesele fundamentale ale citoplasmei prin intermediul unei membrane dublă electronooptic și prevăzută cu pori (anuli) prin care se realizează schimbul reciproc material-informațional nucleu-citoplasmă.

La nivelul nucleului materialul ereditar este organizat într-o substanță numită *cromatină*. Aceasta reprezintă forma interfazică a unor structuri caracteristice care la eucariotele superioare apar doar în timpul diviziunii nucleare și care s-au numit *cromozomi*. Cromatina prezintă două stări funcționale alternative și reversibile: *eucromatina* și *heterocromatina*. Eucromatina prezintă proprietăți de colorare normale cu coloranții bazici și un ciclu de condensare standard (condensare în diviziune, decondensare în interfază). La nivelul eucromatinei de regulă se află secvențe unice de ADN. La nivelul eucromatinei ADN se replică timpuriu, la începutul fazei *S*. Eucromatina reprezintă partea activă genetic (în transcriere) a cromatinei interfazice, la nivelul său aflîndu-se cea mai mare parte din proteinele nonhistone care condiționează funcționarea materialului ereditar în replicare sau transcriere.

Heterocromatina prezintă un ciclu atipic de condensare (alociclic) reprezentînd cromatina care este condensată și în interfază, apărînd sub formă de cromocentri. La nivelul său replicarea ADN este întîrziată. Este inactivă în transcriere și suferă subreplicare. Heterocromatina constitutivă, localizată în regiuni specifice ale cromozomilor cuprinde ADN, care prezintă secvențe repetate de nucleotide. Prin heterocromatinizarea diferențiată a eucromatinei rezultă heterocromatina facultativă.

Heterocromatina se colorează în tot timpul ciclului celular din care cauză se spune că ea manifestă *heteropicnoză* pozitivă. Între eucromatină si heterocromatină apar diferențieri și la nivelul structurii fizice. Astfel, pe cînd eucromatina are ca

elemente ultrastructurale predominante fibrele nucleohistonice de circa 100 Å diametru, la nivelul heterocromatinei se află fibre nucleohistonice de 250 Å, deoarece acestea apar mai condensate, mai contractante, de unde şi reacţia lor Feulgen-pozitivă mai intensă.

Dacă eucromatina cuprinde genele majore, heterocromatina prezintă mai ales funcţii reglatoare controlînd activitatea genelor din eucromatină şi rata mutaţiei, modificînd specific acţiunea unor gene, penetranţa, expresivitatea şi specificitatea lor. Rolul structural al heterocromatinei este legat de stabilizarea structurii centromerice şi a capetelor cromozomului (telomere), de împerecherea cromozomilor în meioză, controlul schimbului reciproc de gene între cromozomi omologi (crossing-over). Rolul funcţional al heterocromatinei este legat şi de controlul transportului substanţelor prin membrana nucleară ca şi de controlul diferenţierii celulare. Cel mai evident rol al heterocromatinei este legat de inactivarea (represia) activităţii genice în mecanismul compensaţiei de doză.

Se disting trei categorii principale de heterocromatină:

— *heterocromatină constitutivă,* prezentă tot timpul şi în toţi nucleii celulelor unui organism fiind localizată în regiuni specifice ale cromozomilor iar în nucleul interfazic se poate aglomera într-o masă cromatică evidentă numită *cromocentru;*

— *heterocromatină facultativă* legată de compensarea dozei de gene la cele două sexe ale mamiferelor prin care unul dintre cromozomii de sex X este inactivat genetic prin heterocromatinizare, realizîndu-se un echilibru între genele sexlincate la cele două sexe la mamifere;

— *heterocromatina condensată* distribuită diferenţiat de la ţesut la ţesut, apărînd în cursul maturării celulare printr-un proces care blochează o anumită informaţie genetică în anumite celule.

Diferitele tipuri de heterocromatină constitutivă pot fi evidenţiate prin metode moderne de colorare a cromozomilor metafazici în care se produc experimental regiuni diferenţiat colorate sau fluorescente care apar sub forma unui model de bandare specific fiecărei specii şi identic pentru cromozomii omologi.

Sînt două categorii majore de modele de benzi:

— *bandare C* evidenţiată prin colorare cu Giemsa după un pretratament specific cu alcalii şi acest model de bandare evi-

dențiază heterocromatina constitutivă aflată de o parte și de alta a centromerului;

— *bandare G* reprezentînd zonele heterocromatice intercalare dispuse deci de-a lungul brațului cromozomului și care se evidențiază în urma unui pretratament cu tripsină (hidroliză sau denaturare enzimatică) și apoi colorare cu Giemsa (bandare G propriu-zisă) cu quinacrină fluorescentă (benzi Q). Deocamdată nu există o explicație cuprinzătoare a naturii chimice a bandării cromozomale.

Compoziția chimică a cromatinei, respectiv cromozomilor eucariotici este reprezentată în special din ADN și histone aflate în proporții aproximativ egale. În plus se mai află cantități variate de proteine nonhistone și o mică cantitate de ARN, ca și lipide, polizaharide și ioni metalici precum Ca^{++} și Mg^{++}, ultimele componente putînd fi eventual contaminanți celulari.

ADN cromozomal formează componenta esențială structurală și funcțională a cromozomului eucariot. Date recente demonstrează echivalența o moleculă de ADN — un cromozom eucariot, stabilindu-se astfel universalitatea relației atît la virusuri și procariote cît și la eucariote.

La eucariote ADN prezintă trei tipuri distincte de secvență: secvențe unice sau nerepetate, secvențe mijlociu repetate și secvențe înalt repetate.

Secvențele mijlociu repetate sînt secvențe simple cu lungimea de 100—500 perechi de baze care sînt repetate de 10^2 pînă la 10^4 ori ce se interpun între secvențe unice, nerepetate.

Secvențele înalt repetate sînt secvențe simple, repetate de 10^6 ori. În urma denaturării, ADN cu asemenea secvențe prezintă o viteză mare de reasociere a monocatenelor spre a forma structuri bicatenare (renaturare) ceea ce nu apare în cazul ADN cu secvențe unice sau ADN viral și procariot. ADN repetitiv se află de regulă în regiunile heterocromatice dispuse la capetele cromozomului eucariot (telomere) sau în regiunea centromerului. ADN repetitiv este de regulă inactiv transcripțional.

ADN cu secvențe mijlociu (intermediar) repetate cuprinde în parte genele ribozomale și pentru ARN*t* și constituie substratul fizic al amplificării (*reiterării*) genice.

ADN cu secvențe unice, nerepetitiv, cuprinde informația genetică pentru sinteza diferitelor proteine celulare.

Cantitatea de ADN repetitiv variază de la 20 la 80% din totalul ADN. La unele specii secvențele înalt repetate sînt reprezentate de 6—13 perechi de baze și în acest caz prin ultracentrifugare în gradient de CsCl sau sucroză asemenea fracțiune de ADN înalt repetitiv se separă ca o bandă aparte de fracțiunea principală de ADN, formînd ceea ce se numește ADN *satelit*.

Genomul eucariot apare ca un genom de tip *interspers* în care secvențele unice alternează cu secvențe înalt sau mijlociu repetate.

ADN mijlociu repetitiv codifică informația pentru sinteza ARN*r*, ARN*t*, ARN 5*S* și histonelor, dar funcția ADN înalt repetitiv nu este pe deplin explicată. Se admite că acesta ar reprezenta o încărcătură excesivă a genomului, un balast evolutiv, dar mai ales ar interveni în reglarea diferitelor funcții genetice, în conservarea formei cromozomilor, ar servi în spațierea genelor, ca dealtfel și în crearea de noi gene.

ADN repetitiv diferă de restul ADN prin conținutul său mai mare în G + C sau mai mare în A + T.

Organismele eucariote superioare, plante și animale conțin în genomii lor o cantitate de ADN suficientă spre a codifica mai mult de 1 000 000 de proteine diferite. Dar sînt date convergente spre concluzia că numai o parte din întregul genom nuclear poate codifica proteine.

La *Drosofila*, pe baza unor analize genetice și biochimice exacte s-a estimat un număr minim de 5—10 000 de gene structurale. La animale toate țesuturile prezintă un set comun de gene funcționale de „întreținere“ de cîteva mii de tipuri diferite pe lîngă alte cîteva mii sau multe mii de gene active ce funcționează diferențiat.

La plante numărul de gene active este estimat de la 3—4000 la drojdie la 13—14 000 la pătrunjel și orz, pînă la 27 000 la tutun. Asemenea date au o valoare pur orientativă.

2.2 1. *ORGANIZAREA GENELOR EUCARIOTE*

Dezvoltarea tehnologiei ADN recombinant care a permis clonarea de gene eucariote în celula bacteriană a dus la aprofundarea cunoștințelor privind organizarea genelor eucariote. Pe această cale s-a stabilit că genele eucariote au o structură mozaicată în care secvențele lor codificatoare respectiv regiunile

care vor fi în final traduse în secvențe de aminoacizi nu sînt continui ci sînt întrerupte de secvențe de inserție sau de intercalare netraduse, numite cu un termen general ADN *silențios*. Cel mai bine studiat caz de organizare a unei gene eucariote care se încadrează în acest tip este gena pentru ovalbumină, o proteină din albușul de ou. În acest caz, secvența genică codificatoare a secvenței de aminoacizi din ovalbumină este separată de 7 regiuni necodificatoare de lungimi variabile interpuse în cadrul secvenței codificatoare și separînd-o pe aceasta în mai multe segmente. Secvența codificatoare de baze care va fi exprimată, deci tradusă în secvența de aminoacizi este deci divizată in regiuni care au fost numite de către Gilbert (1978) *extroni* sau *exoni* pe cînd regiunile interpuse, necodificatoare, transcrise în ARN*m* dar netraduse în proteină s-au numit *introni*. Asemenea organizare genică a fost evidențiată și la alte gene precum: gene pentru ARN*t* de la drojdie, gene pentru histone, gene pentru ARN*r* de la drosofilă, gena globinei de iepure și șoarece, genele imunoglobulinei și genele mitocondriale de la drojdie. Se pare că asemenea organizare este cvasiubicvitară la eucariote.

Gena β-globinei de la șoarece prezintă două inserții, una de 116 și alta de 642 perechi de baze. Gena β-globinei de iepure prezintă o organizare asemănătoare cu aceea de la gena β-globinei de șoarece cu excepția secvențelor de inserție care prezintă o puternică divergență evolutivă.

În cazul genelor pentru hemoglobină și ovalbumină intronii cuprind secvențe unice sau de puține ori repetate, genele structurale fiind reprezentate ca regulă de secvențe unice, nerepetate de ADN.

În cazul genelor hemoglobinei s-a demonstrat transcrierea intronilor în ARN*m* precursor (*pre*-ARN*m*) sau *ARN heterogen* (*hn*ARN) care va fi supus prelucrărilor posttranscripționale spre a da naștere ARN*m* *matur* cel care va funcționa ca mesager în sinteza proteinei.

În cadrul ARN*m* matur și funcțional în traducere nu mai apar secvențele intronice, ceea ce înseamnă că ele sînt excizate în cadrul prelucrării *pre*-ARN*m*. Prelucrarea posttranscripțională a *pre*-ARN*m* se realizează sub acțiunea unor enzime specifice, de tipul RN-azei P. care taie, excizează intronii și apoi, alte enzime, posibil de tipul ligazei ARN numite de altoire, lipesc extronii spre a genera ARN*m* matur (Herzfeld și Kiper, 1979). În cadrul prelucrărilor posttranscripționale ale *pre*-ARN*m* intră și poliadenilarea sa la capătul 3′ și modificarea

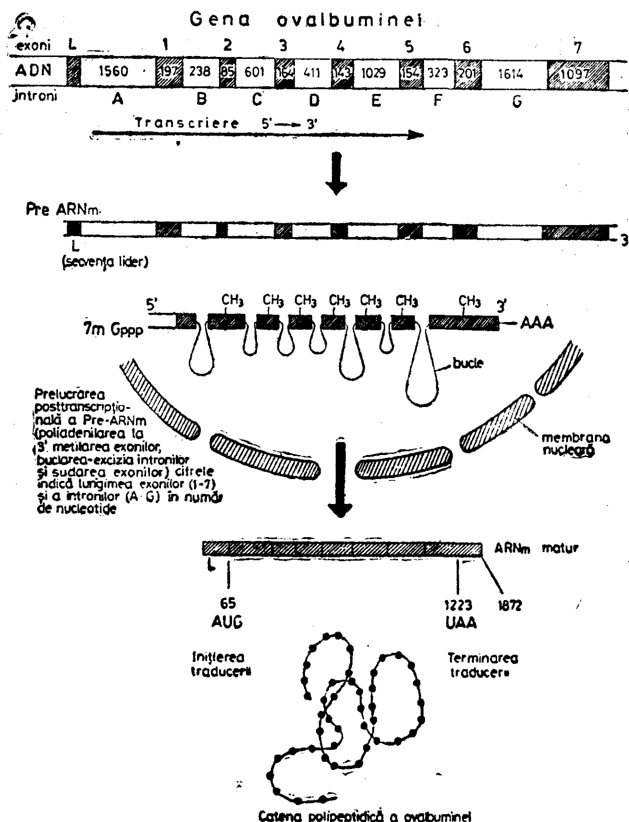


Fig. 33. **Organizarea genei ovalbuminei.**

chimică posttranscripțională a nucleotidelor prin metilare sub acțiunea unor enzime specifice *metilaze.* Această metilare se admite că are loc la nivelul exonilor care astfel devin rezistenți la acțiunea enzimelor exonucleazice. Enzimele de clivare acționează asupra secvențelor intronice care nu au suferit metilarea și astfel au rămas sensibile la enzimele de clivare. Se realizează apoi unirea segmentelor exonice sub acțiunea unor enzime specifice de legare sau altoire *(splicing).* Modelul acesta (Fig. 33) admite că regiunile codificatoare din *pre*-ARN care vor deveni adiacente în cadrul ARN*m* vor fi aduse în nemijlocită contiguitate prin buclarea secvențelor intronice. Regiunile exonice contigui vor fi unite covalent, printr-o reacție de ligare

intracatenară. Buclarea regiunilor intronice, excizia lor şi ligarea ulterioară a regiunilor extronice apar ca rezultat al interacţiunilor complexe acid nucleic — proteine.

Recent, Lerner şi colab. (1980) au implicat în excizia intronilor şi unirea exonilor din precursorul ARN*m* (*pre*-ARN*m*) o categorie de molecule mici, discrete, stabile de ARN *mic nuclear* (*sn*RNA) a căror lungime variază între 90 şi 220 nucleotide. Acest ARN nuclear mic este asociat cu proteine formînd particule nucleare mici ribonucleoproteinice (*sn*RNP). Pe baza observaţiilor că secvenţa de nucleotide de la capătul 5′ al unei asemenea categorii de *sn* RNA prezintă complementaritate cu joncţiunile introni-exoni de la diferite tipuri de ARN*m* pentru insulină de şobolan (5′ Exon CAGGUAUGU → ... Intron CUACUUCCAGG Exon 3′) catena δ_2 a imunoglobulinei, catena β de globină de şoarece, ovalbumina de găină şi fibroina firului de mătase de la *Bombyx*, aceşti cercetători au implicat *sn*RNA în excizia intronilor şi unirea exonilor spre a forma ARN*m* *matur*. În ultimul timp se conferă intronilor anumite roluri funcţionale în prelucrările *pre*-ARN*m*. S-a stabilit că gena mitocondrială pentru citocromul *b* de la drojdie are şi ea o structură mozaicată cu exoni şi introni. Mutaţia poate afecta atît regiunea exonică cît şi cea intronică, evidenţiindu-se peste 200 mutante care au afectată gena citocromului *b*. Mutaţia atît la nivelul intronilor cît şi la nivelul exonilor duce la alterarea structurii şi funcţiei citocromului *b*. Dacă într-o experienţă de complementaţie genetică participă la încrucişare o tulpină A cu mutaţia la nivelul exonului şi o tulpină B cu mutaţia la nivelul intronului (ambele tulpini incapabile de a sintetiza citocrom *b* şi de a fermenta glucoza) la nivelul zigotului apare complementaţia şi se realizează sinteza citocromului *b* funcţional.

Slonimski a demonstrat că exonii normali furnizaţi de celula de tip *B* cu mutaţie intronică servesc la sinteza citrocromului *b* în zigot iar intronii normali furnizaţi de celula tip A, cu mutaţie exonică, furnizează informaţia genetică necesară alipirii exonilor în ARN*m* matur. S-a stabilit astfel, fără echivoc funcţia intronilor în lipirea exonilor.

Echipa lui Slonimski consideră că intronii servesc ca un „model de asamblare“ spre a permite enzimei (enzimelor) de clivare şi unire să realizeze excizia intronilor şi legarea exonilor. O porţiune din intron oferă o secvenţă-ghid care formează cu alte elemente complementare din *pre*-ARN*m* o structură tranzitorie capabilă de a menţine adiacente extremităţile exo-

nilor alăturaţi. Ori, mutaţia la nivelul intronilor împiedică formarea de asemenea structuri tranzitorii. Este posibil ca secvenţa ghid să fie oferită de acele molecule mici de *sn* RNA despre care s-a vorbit mai înainte. Există şi ipoteza că intronii codifică „proteinele mesagere“, diferite de cele codificate de exoni. Aceste proteine au fost botezate „ARN-*maturaze*“. Se admite că primul intron furnizează o proteină de alipire, ARN-maturaza, pe cînd ceilalţi furnizează „secvenţele-ghid“ ale ARN. Proteinele mesagere sau proteinele-*m* ar avea o secvenţă de aminoacizi care la un capăt numit *globul exonic* este hidrofilă, iar la celălalt capăt, corespunzînd la intron, este hidrofobă, prinzîndu-se de anvelopa nucleară, lăsînd capătul hidrofil (globul exonic) liber.

În procesul de traducere a mesajului, ribozomul se asociază cu exonul nr. 1 din ARN*m* şi începe să se formeze o catenă polipeptidică identică la un capăt cu globulul exonic al proteinei-*m*. Această porţiune a proteinei-*m* ar servi în iniţierea catenelor identice polipeptidice sintetizate pe ribozom prin traducerea aceleiaşi molecule de ARN*m*.

Se mai admite că anvelopa nucleară conţine enzimele necesare prelucrării pre-ARN*m*, mai ales cele necesare exciziei intronilor şi alipirii exonilor în ARN*m* matur care va fi trecut în citoplasmă. Aceste ipoteze nu se exclud şi mai degrabă se completează. Este de reţinut că această structură mozaicată a genelor eucariote este specifică lor şi este legată de separarea celor două procese esenţiale ale decodificării informaţiei ereditare, transcrierea şi traducerea în spaţii diferite, primul în nucleul, al doilea în citoplasmă. Trecerea mesagerului prin membrana nucleară este obligatorie şi această trecere se dovedeşte a fi un proces foarte complex.

Recent s-a constatat că gena insulinei umane conţine două secvenţe de intercalare, una în cadrul regiunii transcrise într-un segment netradus 5′ al ARN*m* şi alta care întrerupe regiunea codificatoare C-peptidică (Bell şi colab. 1980). Compararea genelor insulinei umane şi de şoarece arată existenţa de regiuni potenţial reglatoare în cadrul segmentului de ADN ce precede gena sugerînd că forma ancestrală a genei insulinei a avut două secvenţe de intercalare. Dealtfel, la mamifere s-au descris două tipuri de organizare a genei pentru insulină: gena pentru insulină la om şi şobolan II prezintă două secvenţe interpuse pe cînd gena de şobolan I are o singură secvenţă interpusă. Semnificaţia acestei organizări a genelor eucariote este deosebită. Se admite că prezenţa secvenţelor interpuse *(introni)*

a putut accelera evoluția căci a permis construirea de noi proteine din segmente ale genelor deja existente (Eaton, 1980). Potrivit acestei ipoteze, *secvențele codificatoare (exoni)* corespund părților funcționale ale proteinei.

Trebuie precizat că la procariote ADN necodificator *(silențios)* nu apare în interiorul genei ca la eucariote, ci între gene.

ADN al cromozomilor eucariotici este replicat semiconservativ și bidirecțional, fiecare cromozom avînd numeroase unități de replicare (cca $2-10 \times 10^4$ pe celulă), care sînt aranjate în tandem care funcționează asincron și a căror lungime variază între 20 și 70 μm. Replicarea ADN cromozomal se desfășoară mult mai încet decît a ADN bacterian avînd o viteză de 0,5—2,0 μm/minut, față de 30 μm/minut cît este la bacterii.

Replicarea ADN eucariotic necesită sinteză proteinică simultană.

ADN ce se replică timpuriu este relativ bogat în G + C pe cînd cel care se replică tîrziu, de obicei fiind localizat în heterocromatina constitutivă centromerică, este bogat în A+T. Membrana nucleară joacă un rol important în inițierea și desfășurarea replicării.

Asociat cu ADN cromozomal și interacționînd cu grupele fosfat ale acestuia prin forțe ionice și electrostatice se află proteinele cromozomale histonice care au caracter bazic prin care sînt neutralizate grupele acide fosfat.

La eucariote există o cerință strictă ca ADN nou sintetizat să se asocieze cu histonele astfel încît să formeze complexe nucleohistonice. Acest fapt este demonstrat de intima asociere a sintezei ADN și a histonelor în aceeași fază *S* a ciclului celular.

Histonele nou sintetizate se concentrează în vederea asocierii cu ADN nou sintetizat în imediata vecinătate a bifurcației de replicare.

Histonele joacă pe de o parte rol structural în menținerea și controlul conformației cromozomului eucariot în ciclul celular, în spiralizarea și condensarea cromatinei, iar pe de alta în reglarea genică grosieră care duce la diferențierea de modele de represie genică cu specificitate de țesut în timpul dezvoltării.

Histonele acționează astfel ca represorii generalizați ai activității genice căci, condiționînd condensarea cromatinei și superspiralizarea ADN, determină inhibiția sterică a transcrierii în această stare condensată ADN neputînd funcționa ca matriță

în transcriere, numai cromatina difuză prezentînd o intensă activitate de matriță.

Au fost descrise 5 tipuri de histonă simbolizate H_1, H_2a, H_2b, H_3 și H_4. După compoziția în aminoacizi se deosebesc histone bogate în arginină (H_3 și H_4), histone bogate în lizină (H_1 și H_2b) și histone cu conținut aproximativ egal de arginină și lizină (H_2a). În structura cromatinei aceste fracțiuni histonice, cu excepția H_1 intră în cantități echimolare. Studiile de secvențiere a acestor fracțiuni histonice au evidențiat lipsa unei specificități de țesut a lor dar mai ales înaltul conservatism al secvenței lor cu excepția francțiunii H_1 care prezintă o mai mare variabilitate.

S-a realizat o imagine simplistă în ceea ce privește conservatismul secvenței histonelor miezului nucleozomic H_2a, H_2b, H_3 și H_4. Astăzi s-a renunțat la ideea că aceste francțiuni histonice sînt înalt conservate (Isenberg, 1979). În cadrul fiecăreia dintre cele cinci clase de histone H_1, H_2a, H_2b, H_3 și H_4 secvența de aminoacizi poate prezenta anumite variații. Există deci subtipuri ale acestor clase histonice, fie în embriogeneză, fie în timpul maturării unor celule specializate. Variabilitatea histonei H_1 se datorește modificărilor posttraducătoare. Variabilitatea celorlalte clase de histone se bazează pe divergențe evolutive semnificative. În cadrul unei clase particulare de histonă există subtipuri care au structuri primare diferite.

Histona H_2b reprezintă un hibrid evolutiv căci la aceasta cca prima treime a moleculei este variabilă, restul fiind foarte puternic conservată. Histona H_3 de la vițel și plante prezintă divergențe de secvență față de H_3 de la *Tetrahymena* și drojdie. H_4 de la vițel diverge față de H_4 de la *Tetrahymena*. Aceste divergențe sînt însă mult mai mici comparativ cu cele ale altor proteine, astfel că histonele H_3 și H_4 trebuie încă să fie considerate ca proteine înalt conservate. Histonele H_3 și H_4 au partea bazică amino și partea globulară carboxil. Presiunea selectivă a conservat regiunea globulară, în parte din necesitatea interacțiunii histonă-histonă, aceste interacțiuni avînd loc între regiuni globulare. Nu se cunoaște de ce au fost conservate și părțile bazice. Este posibil ca aceste părți bazice să fi fost conservate în vederea stabilirii interacțiunii cu ADN care apare ca substanță acidă.

La *Saccharomyces cerevisiae* se află patru clase de histone dar nu se știe dacă este și histona H_1. Mai mult, histonele H_2a H_2b și H_3 de la această drojdie se deosebesc de clasele corespondente de histone de la plante și animale. H_3 de drojdie de

exemplu prezintă o mai mare mobilitate pe geluri de acid-uree și nu posedă nici cisteină și nici metionină.

Micronucleii de *Tetrahymena* au numai clasele histonice H_2a, H_2b și H_4, fiind lipsite aparent de histonele H_3 și H_1.

În cromatina ciupercilor se află histone care se deosebesc față de cele de la alte eucariote, eritrocitele nucleate de păsări conțin o singură fracțiune histonică desemnată F_2C iar în spermatozoizi — celule foarte specializate care nu sintetizează ARN sau proteine — locul histonelor este luat de *protamine* (proteine foarte bogate în arginină). Rolul histonelor în represia genică generală este demonstrat chiar și prin acest caz al eritrocitelor nucleate de păsări, al căror nucleu este nefuncțional, ADN-ul său fiind represat prin interacțiunea cu histona F_2C sau H_5. Mamiferele au ales o altă alternativă evolutivă a acestei represii — enuclearea eritrocitului matur.

Histonele sînt supuse unor modificări posttraductoare (postsinteză) și anume metilare, acetilare și fosforilare. Prin acetilarea resturilor aminoacilice din histonă este reglată interacțiunea histonelor cu ADN, permițînd funcționarea acestuia ca matriță în transcriere. Alte modificări sînt implicate în realizarea complexelor nucleohistonice dintre ADN nou sintetizat și histonele nou sintetizate sau în modificarea spiralizării cromozomale, ca și în alte fenomene (schimbări în activitatea cromozomală în timpul ciclului celular sau diferențierii, menținerea conformației corecte a histonelor față de ADN). Fosforilarea H_1 în special a fost implicată în condensarea cromozomilor. Schimbările în organizarea structurală a cromatinei sînt necesare pentru progresarea ciclului cromozomal (condensare-decondensare) și se crede că sînt reglate în special prin modificarea proteinelor cromozomale precum fosforilarea, acetilarea, metilarea și poli (ADP-ribozil)-area. Fosforilarea histonei H_1 este se pare cel mai important factor care reglează condensarea cromozomală (Matsumoto și colab., 1980). Forma fosforilată a H_1 este deci implicată în inițierea condensării cromozomale. Activitatea H_1 fosforilate este strîns corelată cu activitatea mitotică a celulelor iar *fosfokinaza* histonei H_1 este implicată în inițierea mitozei.

Rolul specific al variatelor tipuri de histone în structura și funcția cromatinei este încă neprecis stabilit. O modificare a H_2a sub forma de A_{24} apare a fi preferențial localizată în regiuni inactive ale genomului. S-a mai descris și metilarea și ribozilarea histonelor, fără a se cunoaște semnificația acestor modificări.

Genele pentru diferitele fracțiuni histonice sînt prezente în mai multe copii per genom și ele pot fi dispuse în tandem pe același segment ADN. Repetivitatea genelor pentru histone este cerută de necesitatea unei sinteze bogate de histone într-un interval scurt de timp ce corespunde fazei *S* cînd are loc și sinteza ADN. Histonele sînt sintetizate în citoplasmă și apoi transferate în nucleu. Cînd este blocată sinteza proteinică dar nu și a ADN, histonele parentale se leagă numai la unul dintre duplexurile fiice. Sinteza histonelor este intim asociată cu sinteza ADN. Cînd sinteza ADN este blocată, sinteza histonelor scade rapid, deoarece poliribozomii mici asociați cu *ARNm* pentru histone, care este de tip 7 *S*—9 *S*, sînt preferențial dezorganizați. Numai histona H_5 din eritrocitele de păsări nu se sintetizează coordonat cu sinteza ADN. Ea este sintetizată în timpul maturării eritrocitelor, probabil spre a bloca majoritatea genelor nucleare, lăsînd funcționale doar cîteva, în speță genele hemoglobinei aviare. Cea mai importantă caracteristică a genelor pentru histone este gruparea lor strînsă, lincajul strîns dintre genele ce dirijează sinteza tipurilor de histonă (Kedes, 1979). Cele mai intens studiate sînt genele histonice de la drosofilă, dar mai ales de la ariciul de mare. Ele au fost clonate în celula bacteriană prin tehnica ADN recombinant. Genele pentru histone s-au dovedit că, pe lîngă lincajul lor în tandem în ordinea H_4, H_3, H_2a, H_2b, H_1, ele sînt repetitive, printre singurele gene codificatoare de proteine care sînt repetitive. Regiunile codificatoare ale genelor histonice sînt interdigitate cu secvențe spațiatoare necodificatoare. Prin hibridare ARN*m* histone (9 S) cu ADN de arici de mare, s-a arătat că genele pentru histone sînt reiterate de cîteva sute de ori în genomul de arici de mare. Secvențele codificatoare sînt bogate în perechi GC, pe cînd secvențele spațiatoare sînt bogate în perechi AT. Secvențele codificatoare pentru histone reprezintă 0,2% din ADN total de arici de mare, pe cînd secvențele spațiatoare reprezintă 0,5% din genomul haploid.

La numeroase specii de arici de mare s-a reușit alcătuirea hărților unităților de repetiție a genelor pentru histone. S-a demonstrat păstrarea topologiei (localizării și lungimii) regiunilor spațiatoare. La *Drosophila melanogaster*, genele pentru histone se cartează în regiunea 39 D—E din brațul stîng al cromozomului 2. ARN*m* pentru histone de arici de mare, marcat radioactiv, hibridează în aceeași regiune. La om, genele pentru histone au fost cartate pe cromozomul 7, banda negativă G_1 *q* 34.

Genele pentru histone de la drojdie au o organizare ceva diferită de aceea a genelor histonelor de arici de mare și drosofilă.

În afara histonelor, în structura cromatinei mai intră și proteinele nonhistone numite încă *hertone*, incorect numite proteine acide deoarece punctul izoelectric al lor variază din zona acidă pînă în zona bazică. Ele reprezintă enzime ale metabolismului cromozomal cum ar fi ADN *polimeraza*, ARN *polimeraza*, NAD — *sintetaza*, *nucleosidtrifosfataza*, apoi diverse alte proteine cu caracter acid precum molecule proteinice implicate în activitatea genică, activatori și represori ca și alte proteine cromozomale. Proteinele nonhistonice sînt sintetizate în citoplasmă și apoi transferate în nucleu. Ele sînt foarte variabile, heterogene, atît ca structură cît și ca funcțiune, prezentînd o viteză mult mai mare de sinteză și de degradare *(turnover)* comparativ cu histonele. Greutatea lor moleculară variază între 10.000 și peste 150.000 de daltoni pe cînd a histonelor este circumscrisă în limitele a 10.000—20.000 daltoni.

Proteinele nonhistonice se caracterizează prin specificitate de țesut și specificitate de specie. Aceste proteine sînt implicate în reglajul fin al activității genice, din interacțiunea lor cu histonele rezultă derepresia unei gene date și transcrierea pe segmentul corespunzător din ADN. Ele pot interacționa nu numai cu histonele dar și cu ADN și ARN. Zonele din genom active în transcriere sînt mult mai bogate în proteine nonhistone decît cele inactive în transcriere. Același lucru este valabil pentru celule și țesuturile în care au loc sinteze active și care prezintă o cantitate mai mare de proteine nonhistonice.

În reglarea transcrierii genice un rol important îl joacă fosforilarea proteinelor nonhistonice. Prin această modificare a proteinelor nonhistonice histonele pot fi scoase din complexele nucleohistonice ale unui segment dat din genom, lăsînd posibilitatea ca gena sau genele din acea regiune să fie transcrise și deci să funcționeze.

Deținători ai informației ereditare, cromozomii sînt în număr, mărime și formă caracteristici fiecărei specii. Totalitatea cromozomilor unei celule formează complementul său cromozomal numit încă *genom*. Numărul de cromozomi al oricărei celule somatice la indivizii ce se reproduc pe cale sexuată este dublu (diploid) față de complementul cromozomal al celulelor reproducătoare (gameți).

La microscopul optic cromozomii apar ca structuri sferice sau baghetiforme, cu dimensiune variabilă între 1 și 30 μm.

La organismele ce se reproduc pe cale sexuată în complementul cromozomal cromozomii se află sub formă de pereche, fiind doi cîte doi omologi, la nivelul fiecărei perechi un cromozom fiind de origine paternă (adus de spermatozoid în timpul fecundării, la formarea zigotului) iar altul fiind de origine maternă (adus de ovul la nivelul zigotului). Din unirea garniturilor haploide ale gameților în procesul fecundării se reface în zigot o garnitură diploidă care prin diviziunile mitotice succesive ale acestuia va fi transmisă fiecărei celule a organismului ce rezultă.

Cromozomii omologi au aceeași structură și funcție (poartă aceleași gene, aceeași informație ereditară). Omul are de exemplu în garnitura diploidă a tuturor celulelor somatice cîte 46 de cromozomi, dintre care 23 de proveniență maternă și 23 de proveniență paternă. Aranjamentul cromozomilor, prin dispunerea lor ordonată în perechi de cromozomi, considerînd numărul, forma, mărimea și orice altă caracteristică specifică complementul cromozomal al unei specii sau linii celulare duce la obținerea *cariotipului* acelei specii sau linii celulare.

Cariotipul uman a fost stabilit în anul 1956 de către Tjio și Levan, a fost standardizat prin conferințele de la Denver, Londra și Chicago și definitivat ulterior, pe baza studiului modelelor de bandare (colorare diferențiată a cromozomilor) la Conferința de la Paris din anul 1971.

Metodele de bandare au permis nu numai identificarea exactă a omologilor din cadrul fiecărei perechi de cromozomi, care se poate face cu o anumită doză de relativitate datorită subiectivismului cercetătorului și prin metodele clasice dar, pe baza comparării modelului de benzi al omologului matern și al omologului de origine paternă, s-au putut stabili modificările exacte, structurale, ale cromozomilor, modificări care au stat la baza evoluției cariotipului ce a însoțit evoluția speciei sau stau la baza diferitelor maladii numeric și mai ales structural-cromozomale. În cadrul fiecărei perechi de cromozomi, modelul de benzi trebuie să fie identic la cei doi omologi în condiții normale.

Cariotipul uman este alcătuit din 22 perechi de *autozomi* (cromozomi identici la ambele sexe) și o pereche de cromozomi de *sex* sau *heterozomi,* identici sau omologi la femeie (XX) și neidentici, neomologi, nepurtînd aceleași gene la bărbat (XY).

Cromozomii din perechile 13, 14, 15, 21 și 22 sînt cromozomi *organizatori nucleolari (NO)* din care cauză sînt afirmații după care la origine, specia umană ar fi un pentaploid. Maimuțele

antropoide au un cariotip asemănător oarecum celui uman. Cimpanzeul, cel mai apropiat de om are 48 de cromozomi și se admite că dintr-o specie comună au putut deriva specia umană și primatele prin remanieri numeric și structural cromozomale de tip *fuziune-fisiune centrică* sau *aneuploidii.*

Prezența unui cromozom suplimentar în perechea 21 condiționează un sindrom foarte grav al *trisomiei* 21 sau *mongolismul.*

Aproape toate anomaliile numerice care afectează cromozomii sînt corelate cu apariția de grave sindroame cu defecte fizice și psihice. Și aberațiile structural cromozomale sînt extrem de grave. Deleția parțială a brațului scurt al cromozomului din perechea a 5-a condiționează sindromul *cri-du-chat* (țipătul pisicii) cu înapoiere mintală a copilului și moarte prematură. În leucemie este de asemenea implicată o translocație între cromozomii 9 și 22. Studiul cariotipului este deci de interes major atît la plante cît și la animale incluzînd omul. La porumb există o garnitură diploidă de 20 cromozomi care alcătuiesc 10 perechi. Deci în fiecare celulă se află două seturi identice de cromozomi. Cromozomii de la nivelul unui set sînt însă neomologi, sînt diferiți ca morfologie și dimensiune, purtînd și gene diferite. La organismele diploide informația ereditară apare astfel *redundantă.*

Organizarea multicromozomală a genomului eucariot este cerută și de particularitățile realizării recombinării genetice la eucariote cu implicații în conferirea unei mai mari flexibilități evolutive.

Cromozomul eucariot prezintă două unități structurale longitudinale care au fost numite *cromatide,* libere pe toată lungimea cromozomului cu excepția unei regiuni care s-a numit *constricție primară* la nivelul căreia este localizat *centromerul,* o zonă specializată a cromozomului pentru atașarea sa la fibrele fusului de diviziune. Regiunea centromerică constă din numeroase fibre cromatice, așezate latură pe latură, ce pot trece de la un braț la altul cromatidei (fibre intercromatidice).

Morfologia cromozomului eucariot este determinată de plasarea constricției primare de-a lungul acestuia. Astfel, cromozomul este *metacentric,* prezentînd două brațe egale cînd centromerul este localizat în poziție mediană. Cînd centromerul este plasat în afara regiunii mediane apar două brațe cromozomale inegale și cromozomul se numește *submetacentric.* Cînd centromerul se află deplasat spre un capăt al cromozomului apar două brațe inegale dintre care unul foarte lung și altul

foarte scurt, izodiametric și cromozomul se numește *subtelocentric*. În sfîrșit, atunci cînd centromerul se află pe capătul cromozomului, deci terminal, există un singur braț cromozomal și cromozomul se numește *telocentric*.

La nivelul cromatidei au fost descrise filamente spirale, reciproc încolăcite care s-au numit *cromoneme* și care prezintă din loc în loc îngroșări care s-au numit *cromomere*. Cromomerele conferă cromonemei un aspect moniliform foarte evident în timpul profazei din mitoză, dar mai ales din meioză, aranjamentul și numărul cromomerelor fiind o caracteristică de specie.

Structura bicromatidică a cromozomului eucariot metafazic este caracteristică perioadei cuprinse între apariția cromozomilor la debutul diviziunii nucleare și sfîrșitul metafazei.

La nivelul fiecărei cromatide-surori din cromozomul metafazic se află cîte un dublu-helix ADN. *Mononemia* sau *uninemia* cromozomului eucariot a fost dovedită pentru prima dată autoradiografic în 1957 de către Taylor și colab. (1957) și apoi prin cercetări biochimice pe ADN din cromozomii de drosofilă de către Kavenoff și colab. (1973). Aceeași uninemie apare în cromozomul anafazic echivalent de fapt cu o cromatidă a cromozomului metafazic. Ipoteza uninemiei cromozomului eucariot este susținută de dovezi biochimice, ultrastructurale și genetice. Recent, Okada și Comings (1979) au evidențiat la nivelul cromozomilor metafazici de hamster chinezesc tratați cu acetat de amoniu 4*M* și întinși pe suprafața apei distilate, existența unei organizări de un ordin mai înalt a ADN, care în urma unui asemenea tratament este eliberat sub forma unor serii regulate de rozete conectate de porțiuni liniare de ADN numite *interrozete*. Lungimea medie a regiunii în care molecula ADN capătă configurația de rozetă este de 14 μm care este apropiată de lungimea medie de 10 μm a ADN cromomeric din cromozomii politenici de drosofilă. Segmentul interrozetă are o lungime medie de 4,2 μm. Proteinele matrixului nuclear nehistonice care includ și cantități semnificative de *actină* și *tubulină* sînt implicate în formarea rozetelor.

Cea mai lungă piesă de ADN descrisă în nucleii celulelor umane are 22.000 μm. Taylor și Hozier (1976) au stabilit că unitatea de replicare la celulele ovariene de hamster chinezesc este de 4 μm lungime, ceea ce implică cca 550.000 situri de inițiere în nucleul diploid (2.200 000 um : 4 μm). Complementul uman diploid conține $6{,}9 \times 10^{-12}$ gm de ADN. Împărțind această valoare cu $3{,}14 \times 10^{18}$ gm/μm de dublu helix ADN se

calculează 2,2 metri (2.200.000 μm) de ADN per nucleu diploid uman (Bahr, 1977).

Caracteristic pentru eucariotele evoluate este existența unui ciclu cromozomal numit *ciclul condensării* și *decondensării cromozomului*. Cromonemele sau cromonemata — cele două fibrile longitudinale ale cromozomului eucariot — prezintă proprietatea de a se spiraliza mai mult sau mai puțin (spiralizare cromozomală) ceea ce determină variații în forma cromozomilor în timpul ciclului celular. Spiralizarea cromonemelor este însoțită de condensarea cromozomului, procesul atingînd maximum în metafază cînd cromozomul prezintă cea mai constantă morfologie. În timpul diviziunii cromozomul apare sub forma sa transportoare, formă cerută de o repartizare echilibrată a informației ereditare în celulele fiice. După realizarea acestei repartizări care are loc în anafază și desăvîrșită în telofază cromozomul trece de la forma transportoare la forma sa funcțională în cadrul nucleului interfazic. În forma funcțională cromozomul atinge gradul maxim de spiralizare a cromonemelor, însoțită de decondensarea și desigur pierderea individualității cromozomului. Materialul cromozomilor se va organiza sub înfățișarea cromatinei interfazice. Se pare că doar cromonemele își păstrează continuitatea atît la nivelul cromozomilor cît și la nivelul nucleului interfazic. Se cunosc puține lucruri despre cauzele și mecanismele spiralizării și despiralizării cromozomului eucariot. Cercetările din ultimul timp pun pe seama fosforilării proteinelor cromozomale histonice, în speță a H_1, condensarea cromatinei la debutul diviziunii.

Nucleul interfazic este metabolic activ, la nivelul său avînd loc intense sinteze ale componentelor majore ale celulei și în primul rînd sinteza ADN și a proteinelor cromozomale histonice. Dublarea cantității de ADN este o condiție necesară desfășurării mitozei și impune diviziunea. Cînd replicarea cromozomilor nu este urmată de diviziunea nucleului și ulterior a citoplasmei iau naștere *diplocromozomi*, cromozomii fii neseparîndu-se în două celule fiice, rezultînd o celulă care este endoploidă avînd o cantitate dublă, sau corespunzînd la un multiplu al cantității diploide de cromozomi, depinzînd de numărul de cicluri de replicare desfășurate fără interpunerea mitozei. Un caz interesant este oferit de celulele glandelor salivare de diptere în care endociclurile duc la formarea cromozomilor *politeni*. Prin politenie se înțelege desfășurarea de runde multiple de replicare a cromozomilor, fără ca cromatidele

fiice să se separe în nuclei fii diferiți. Rămînînd asociate ele realizează o structură cromozomală politenică în care alternează benzi clare și benzi întunecate dispuse transversal, perpendicular pe lungimea brațului cromozomal. Cromozomii politeni reprezintă astfel forma interfazică a cromozomilor obișnuiți la nivelul cărora s-au desfășurat multiple runde de replicare. Dimensiunea unor asemenea cromozomi este de peste 200 ori mai mare ca a cromozomilor obișnuiți din care derivă. Deoarece are loc un proces de împerechere somatică a cromozomilor omologi în timpul politenizării lor, numărul cromozomilor politeni aparent reprezintă jumătate din acela al cromozomilor obișnuiți.

Din asocierea intimă (împerecherea) la același nivel a cromomerelor identice ale celor doi omologi rezultă un model de bandare specific fiecărei specii, pe baza căruia se poate alcătui o cartare citologică a genelor, admițînd că fiecărei benzi îi corespunde o genă. În anumite regiuni benzile (cromomerele) prezintă o dispunere laxă, deslînată a fibrilelor, rezultînd structuri caracteristice care s-au numit *pufe*, iar cele care au o extindere mai mare au fost numite *inele Balbiani*. La nivelul acestor structuri a fost evidențiată prin experiențe autoradiografice cu ^{3}H-uridină, desfășurarea unei intense transcrieri genetice. În cursul dezvoltării ontogenetice pufele apar într-o anumită ordine, indiciu că are loc o activare diferențiată, eșalonată a genelor, în funcție de necesitățile de moment ale celulei.

Cromozomii politeni au fost descriși și la angiosperme, protozoare, în unele celule transformate malign. La plante cromozomii politeni nu sînt împerecheați, prezentînd o structură granulară, fără a prezenta benzi distincte.

Cromozomii politeni apar în celulele înalt diferențiate care nu se mai divid și deci care reprezintă punctul terminus al unei linii celulare date. Astfel, cromozomii politeni nu vor mai reveni niciodată la forma obișnuită, celulele în care se află (de exemplu cele din glandele salivare ale larvelor de diptere) funcționînd foarte intens într-un moment precis circumscris al ontogeniei după care mor (glandele salivare ale adultului se dezvoltă ulterior din celule care au cromozomi obișnuiți). Politenia ajută tocmai în realizarea unei asemenea funcționări la parametri metabolici maximi.

În timpul meiozei în nucleul ovocitei primare, mai ales la batracieni dar și alte vertebrate și nevertebrate s-a descris un tip special de cromozomi care apare mai ales în stadiul de di-

ploten prelungit. Acest tip de cromozomi numit *lampbrush* (în perie de sticlă de lampă) este specific acestei faze și este reversibil, căci în fazele ulterioare ale meiozei el revine la forma tipică de cromozomi specifică acelei specii. Acest tip de cromozomi apare și în spermatogeneză la *Drosophila*. Dimensiunea cromozomului *lampbrush* poate depăși pe aceea a cromozomului politen ajungînd la 1 mm, dar diametrul său este foarte subțire. Din cromomerele sale sînt proiectate lateral bucle în perechi avînd diferite forme și dimensiuni (Fig. 34). Aceste bucle au o axă fină reprezentată de ADN și din ea sînt proiectate fibre care sînt acoperite de un matrix ce este alcătuit din ARN și proteină.



Fig. 34. Cromozomi „lampbrush" din ovocite de *Tritutus viridescens*. Ei reprezintă bivalenți (cromozomi omologi) și deci două stucturi bicatenare de ADN prezentînd regiuni strîns spiralizate-cromomerele.

Aflîndu-se în mijlocul profazei primei meioze se înțelege că fiecare cromozom *lampbrush* reprezintă de fapt un bivalent, adică doi cromozomi omologi împerecheați. Bucla laterală apare în acest caz ca unitate de transcriere. Fiecare buclă apare asimetrică în sensul că la nivelul uneia dintre inserțiile sale în cromomeră este fină și lipsită de fibre reprezentînd capătul său gol, nud, de la care se remarcă un gradient de lungime al fibrelor ce sînt proiectate din buclă, la început scurte și devenind progresiv mai lungi pe măsură ce se apropie de celălalt capăt al buclei unde se inseră în cromomeră. Este posibil ca la nivelul capătului gol sinteza ARN să fie blocată sau asimetria să apară ca un rezultat al polarizării formării buclei. Buclele sînt considerate a reprezenta modificări reversibile ale structurii cromozomale la nivelul unor gene active, acest fapt fiind

demonstrat şi de reducerea sau anularea lor atunci cînd se acţionează cu inhibitori ai transcrierii genetice. La unele urodele (salamandră de exemplu) din unele bucle care sînt omoloage pufelor cromozomilor politeni, se desprind continuu structuri circulare care conţin ADN şi care reprezintă nucleolii extracromozomali, rezultaţi în urma unui proces de extrareplicare care se numeşte *amplificare genică.* Printr-o asemenea extrareplicare, cantitatea de ADN se măreşte considerabil, uneori depăşind chiar cantitatea de ADN a cromozomilor înşişi.

Între cromozomii *politeni* şi cromozomii *lampbrush* apar unele asemănări cum ar fi amplificarea genică, fenomenul de pufare — respectiv buclare, structura cromomerică, împerecherea omologilor (în primul caz este vorba de o împerechere somatică, în al doilea de o împerechere normală meiotică).

Marea deosebire dintre aceste două tipuri particulare de cromozomi, dar de excepţională importanţă în înţelegerea fenomenului ereditar, este că în cazul cromozomilor politeni, spre deosebire de cromozomii *lampbrush,* transformarea (metamorfoza) este ireversibilă. Ei nu vor mai reveni la forma normală, tipică a cromozomilor obişnuiţi ci funcţionează într-un stadiu critic al vieţii celulei, respectiv individului (stadiul larvar III) cînd sînt necesare sinteze de proteine, respectiv enzime ale glandelor salivare. După îndeplinirea rostului lor, celulele glandelor salivare se autolizează şi odată cu ele şi cromozomii uriaşi — politeni.

Cromozomii lampbrush, după ce îşi îndeplinesc funcţia lor de sinteză intensă de ARNr revin, începînd din *diachineză* şi mai ales în *metafaza* I a meiozei, la forma normală de bivalenţi asigurînd continuitatea genetică în linia germinală.

2.2.2. *STRUCTURA ELECTRONOMICROSCOPICĂ A CROMATINEI ŞI A CROMOZOMULUI EUCARIOT*

Cercetările de microscopie electronică asupra cromatinei interfazice ca şi a cromozomului metafazic au stabilit că unitatea de structură a cromatinei eucariote este *nucleosomul,* o structură periodică, repetitivă de histone şi ADN. Fibra de cromatină este flexibilă şi pe ea se află particule sferice dispuse precum mărgelele într-un şirag. Nucleosomii se află deci atît în

cromatina interfazică cît și în cromozomul metafazic, în eucromatină și heterocromatină, pe această bază putîndu-se explica continuitatea structurală la nivel celular a materialului genetic la eucariote.

Particula nucleosomală are un diametru de 70—110 Å. Nucleosomul este alcătuit dintr-un octamer histonic în care intră în cantități egale fracțiunile histonice H_2a, H_2b, H_3 și H_4 dar în dublu exemplar. Octamerul histonic are o greutate moleculară de 110.000 daltoni. El se asociază cu ADN de lungime corespunzînd la 200 perechi de baze. ADN stă la periferia octamerului înfășurat ca o superhelice plată (Fig. 35). Între particulele nucleosomice se află de asemenea ADN, lung de 1,8—3 *nm*, neasociat cu histone. Nu se știe încă cum participă fracțiunea histonică H_1 la structura cromatinei.

În ciuda unor deosebiri de vederi privind forma și dimensiunea nucleozomului, numărul de perechi de baze asociate acestuia și lungimea ADN intercromozomal este clar că nucleozomul este o unitate de bază a cromatinei eucariote. Dimensiunile sale sînt de 70—125 Å, formă de disc (se mai numește și *platizom*) sau sferică, fiind înfășurat de 2 ori și jumătate într-o dispoziție încrețită de o lungime de ADN care are 140—200 de perechi de nucleotide. După Gottesfeld și colaboratorii (1975) numai porțiunile inactive ale ADN sînt organizate în nucleozomi. Histona H_1 este implicată în superspiralizarea nucleozomilor și a ADN internucleozomal și împachetarea lor în fibra de cromatină (Bahr, 1977).

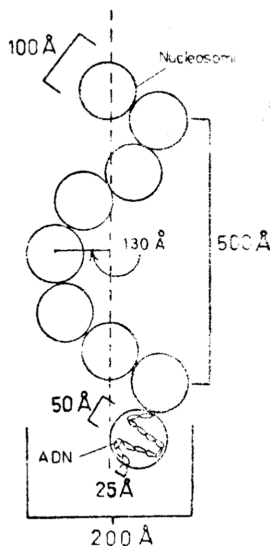


Fig. 35. Relația dintre structura ADN, oligomeri histonici și fibrile de cromatină de diferite dimensiuni (grosimi). Duplexul ADN de circa 25 Å diametru este supraspiralizat în interiorul subunităților cromatinei (NUCLEOZOMI cu un pas (înălțime) de 50Å spre a da o fibră de 100 Å așa cum apare la microscopul electronic. Întregul complex nucleohistonic este din nou spiralizat (înfășurat) cu un pas de 500 Å și o rază de 130 Å spre a da o fibră de 200 Å așa cum se vede la microscopul electronic. Porțiunile (întinderile) de ADN liber dintre nucleozomi în mod normal sînt mai lungi decît este arătat în această schemă.

În fibra de cromatină ADN se află sub forma superspiralizată raportul lungime ADN : lungime fibra de cromatină fiind de cca 30 la 1. Nucleozomii sînt menţinuţi în fibra de cromatină prin cooperarea proteinelor specifice cum ar fi histona H_1, nonhistonele şi proteinele contractile.

Cînd celula trece prin stadiul postreplicativ G_2 al ciclului celular, cele două fibre replicate în stadiul precedent de sinteză S al interfazei se condensează spre a forma jumătatea unui cromozom (cromatida), pliindu-se în cromatide surori. Fiecare cromozom este pliat într-o configuraţie specifică în metafază.

Structura electronomicroscopică a cromozomului eucariot relevă natura fibroasă a fibrei nucleohistonice care nu prezintă capete libere.

Cercetări recente efectuate de către Loemmli de la Universitatea Princeton din New Jersey arată că organizarea cromatinei în cromozomul metafazic are la bază o reţea de proteine nonhistonice. Îndepărtînd histonele şi majoritatea proteinelor nonhistonice din cromozomii metafazici umani a ajuns la constatarea că ADN cromozomal rămîne într-o structură organizată şi compactă care apare ca un miez central ce prezintă morfologia cromozomilor metafazici intacţi, fiind înconjurat de un halou de ADN. Structura miezului central este dezorganizată în urma tratamentului moderat cu tripsină. Produşii de digestie au fost analizaţi electroforetic. S-au evidenţiat peste 30 fracţiuni de proteine nonhistonice. Aceste cercetări aduc date noi referitoare la structura cromozomului eucariot şi arată că aceasta se bazează în primul rînd pe existenţa unei matrice de proteine nonhistonice care conferă cromozomului metafazic forma sa caracteristică. Aceste cercetări urmează să fie confirmate.

2.2.3. *COMPLEXUL SINAPTINEMAL*

În meiocite apare ca structură caracteristică prezentă doar la eucariote *complexul sinaptinemal* (C. S.) descris pentru prima dată, în 1956, de către Moses. C. S. este o structură tripartită (Fig. 36) evidenţiată numai electronomicroscopic, prezentînd două componente laterale şi o regiune centrală mai puţin electrondensă numită *spaţiu de împerechere*. Regiunea centrală are o lăţime constantă de 1000 Å, reprezentînd şi distanţa din-

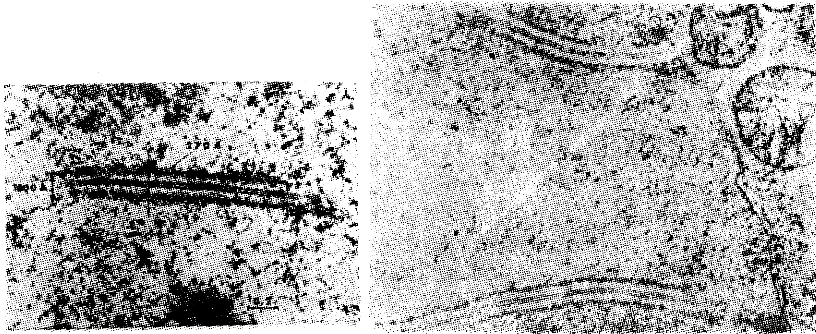


Fig. 36. Complexul sunaptinemal (CS). A. în spermatocitele de *Philaenus spumarius* se remarcă dimensiunile complexului sinaptinemal în absenţa materialului cromatic. Mărire *x* 78.000. B. complexe sinaptinemale multiple, în legătură directă cu membrana nucleară, *x* 48.000 (după Maillet şi Foillot, 1965).

tre cromozomii omologi în *pachiten*, indiferent de lungimea cromozomilor omologi şi conţinutul de ADN din aceştia. În regiunea centrală se află elementul central care are 200 Å diametru. Spaţiul dintre regiunea centrală şi elementele laterale este traversat de filamente fine. La lăcuste şi ascomicete, componentele laterale apar ca o structură bandată cu o periodicitate de aproximativ 100 Å. Cromatina cromozomilor omologi vine în contact cu elementele laterale ale C. S., pe întreaga lor lungime. Ambele capete ale bivalentului sînt ataşate la membrana nucleară prin telomerele lor. La formele la care în pachiten apare o distribuţie în buchet a bivalenţilor, ambele capete ale bivalenţilor sînt ataşate într-o regiune restrînsă a membranei nucleare, adiacentă centriolului. Formarea CS începe cu sinteza unei componente laterale în spaţiul dintre cromatidele-surori ale fiecărui cromozom *leptotenic* (încă aflat sub formă de univalent, neîmperecheat cu omologul său) şi capetele fiecărui cromozom leptotenic (avînd între cromatidele sale un element lateral), sînt ataşate la membrana nucleară. Are loc alinierea relativă a cromozomilor omologi pe un spaţiu de cca 3000 Å, fără a se cunoaşte mecanismul prin care se realizează această împerechere prealabilă a omologilor. Elementele laterale ale C. S. ce aparţin omologilor se asociază avînd loc asamblarea C. S. care determină o împerechere foarte exactă, cromomeră la cromomeră, punct la punct a celor doi cromozomi omologi cu formarea bivalenţilor. Pentru asamblarea C. S., elemen-

tele laterale ale fiecărui omolog suferă o transpoziție dintre cromatidele surori spre exterior, deplasare determinată de rotirea cromatidelor surori față de componenta laterală. Este posibil ca componenta centrală a C. S. să derive din elementele laterale omoloage prin existența unor fibrile dar Westergaard și Wettstein (1971, 1972) admit că elementul central al C. S. ar fi sintetizat în nucleol de unde migrează la locul de unire a elementelor laterale. În diplotenul tîrziu C. S. se dezorganizează iar omologii sînt respinși de la nivelul bivalentului fără însă a se separa, rămînînd uniți la nivelul chiasmelor — semnul citologic al schimbului intercromozomal (crossing-over), C. S. mediind schimbul dintre moleculele de ADN ale omologilor.

C. S. apare ca o structură ribonucleoproteinică. Această aserțiune se bazează pe rezultatul digestiei enzimatice cu DN-*ază* care dizolvă cromatina bivalentului fără a altera structura complexului sinaptinemal.

Rezultă că ADN nu este un component major al C. S., putînd fi prezent însă în cantități infime. În schimb, ribonucleaza dezorganizează regiunea centrală și cea mai mare parte a elementelor laterale.

Prezența componentei proteinice în C. S. este dovedită de rezultatul digestiei cu enzime proteolitice (tripsina). Elementele laterale dau reacții citochimice care indică prezența în ele de proteine bazice de tip histonă, regiunea centrală dînd reacție citochimică diferită de aceea a elementelor laterale.

Există unele afirmații după care ADN rămas nereplicat în faza S premeiotică și replicat în zigoten (Stern și Hota, 1969, Hota și Stern, 1971) ar media împerecherea cromozomilor omologi dar după alți autori (Westergaard și Wettstein, 1972) însăși componenta laterală a C. S. poartă informația pentru împerecherea sit la sit a cromatidelor cromozomilor omologi.

Complexele sinaptinemale mediază formarea de heteroduplexuri ADN. După unele ipoteze ar exista gene care codifică sinteza unor proteine alosterice de imperechere, capabile să se atașeze la anumite secvențe de nucleotide. Ar exista două tipuri de asemenea proteine de împerechere, unele caracteristice regiunilor eucromatice, altele caracteristice regiunilor heterocromatice. După altă ipoteză ar exista gene de fuziune care ar dirija sinteza unor proteine de împerechere bivalente specifice celor doi cromozomi omologi ai fiecărui bivalent. Aceste gene ar fi derivat printr-un crossing-over inegal între cromozomi omologi.

3. CARACTERISTICILE ORGANIZĂRII EUCARIOTE

1. Închiderea materialului ereditar într-un spaţiu genetic reprezentat de nucleu.

2. Asocierea permanentă a ADN şi histonelor cu formarea fibrelor nucleohistonice.

3. Prezenţa a trei clase de secvenţă în ADN: secvenţe unice, secvenţe moderat repetate şi secvenţe înalt repetate.

4. Diferenţierea a două stări funcţionale ale cromatinei — eucromatina şi heterocromatina.

5. Evoluţia unui ciclu de condensare şi decondensare a cromatinei.

6. Organizarea unui fus de diviziune care asigură repartizarea echilibrată a produşilor de replicare.

7. Specializarea la nivelul cromozomului a unei regiuni de ataşare la fibrele fusului de diviziune — centromer (cinetochor).

8. Organizarea nucleolului ca structură intranucleară specializată în sinteza ARN ribozomal. El este asociat cu regiunea *organizator nucleolară (N. O.)* a unuia sau a mai multor cromozomi.

9. Apariţia unui centriol cilindric cu formula ultrastructurală 9×3 filamente, implicat în organizarea fusului de diviziune.

4. PROCARIOTE-EUCARIOTE, O COMPARAŢIE

Procariotele prezintă ADN necomplexat cu proteine bazice histonice (cu unele excepţii — *E. coli, Anabaena, Aphanocapsa*). ADN procariot nu prezintă secvenţe repetate (excepţie gene ribozomale prezente în cîteva copii). Nici ADN viral nu prezintă secvenţe repetate de baze cu excepţia fagilor din grupa *T* pară (T_2, T_4, T_6) al căror cromozom prezintă repetiţii de baze la fiecare capăt. Procariotele nu au materialul ereditar încadrat întru-un spaţiu genetic definit.

Cantitatea de ADN este mult mai mare la eucariote, corespunzînd unei cantităţi mai mari de informaţie ereditară (tabelul 2).

Tabelul 2

Date cantitative privind genomul viral și celular (după J.H. Taylor)

Grupa	Specia	μμ ADN/genom	Lungimea cromozomului (μm)	Număr de cromozomi (n)
Virusuri	Polioma		0,00158	1
	φX 174		0,00186	1
	fagul T 7		0,0122	1
	fagul λ		0,0172	1
	fagul T 4		0,0520±6	1
	Virusul Fowlpox		0,0930±6	1
Bacterii	E. coli Lark	0,45 × 10^{-2}	1,530	1
	E. coli Cairns		1,400	1
Alge	Chlamydomonas	3 × 10^{-2}	10,200	16
Ciuperci	Drojdie	1,8 × 10^{-2}	6.12	15
	Neurospora	4,6 × 10^{-2}	15,64	7
Angiosperme	Raphanus sativus	2,5	850,00	9
	Vicia faba	22,0	7.480	6
	Lilium longiflorum	53	18.020	12
	Xanthorhiza	0,45	153	18
	Aquilegia	0,45	153	7
Nevertebrate	Drosophila melanogaster	0,18	61,2	4
	Chironomus pallidivittatus	0,20	68,0	4
Vertebrate	Pești (specii diferite)	0,7–2,8	238–952	24–30
	Dipnoi: Protopterus	50	17.000	19
	Lepidosiren	124	42.160	19
	Amphibia	4,9	1.666	13
	Bufo	24,6	8.364	13
	Salamandra			
	Plethodon	94,5	32.130	12
	Necturus maculosus			
	Reptile			
	Ord. Squamata	2,1–2,3	714–782	18–23
	Ord. Crocodylia	2,9–3,1	986–1054	21
	Păsări	3,1–4,2	1054–1428	
	Mamifere-hamster	3,5	1190	
	Om	3,0	1.020	23

Eucariotele conțin de cca sute de mii de ori mai mult ADN decît virusurile și de mii de ori mai mult decît bacteriile. Există însă mari variații cantitative chiar în cadrul aceluiași grup de organisme eucariote. Drojdiile bunăoară, eucariote tipice, conțin o cantitate de ADN nu cu mult mai mare decît bacteria *E. coli*, pe cînd în nucleii unor dinoflagelate se află mai mult ADN decît la om. Nu există deci o relație simplă, directă între cantitatea de ADN și aceea de informație ereditară. (ADN nerepetitiv).

5. GENOMUL EXTRANUCLEAR

La eucariote, în afara nucleului se află molecule informaționale de ADN cantonate la nivelul unor organite specifice precum *mitocondriile* și *cloroplastele* ca și în *kinetozomii* de la ciliate, *granulii bazali* ai flagelilor organismelor flagelate și *kinetoplastele* de la *Trypanosomidae*. Din această cauză celula eucariotă apare ca o structură multigenomică în care, alături de un genom nuclear există cel puțin alți doi genomi diferiți extranucleari — genomul cloroplastic specific celulei vegetale și genomul mitocondrial, comun celulei vegetale și animale (Fig. 37), ADN organitelor, localizat în matrixul acestora, prezintă un aspect ultrastructural similar aceluia al *nucleoidului bacterian* sau *cianobacterian*, în care se remarcă o rețea tridi-

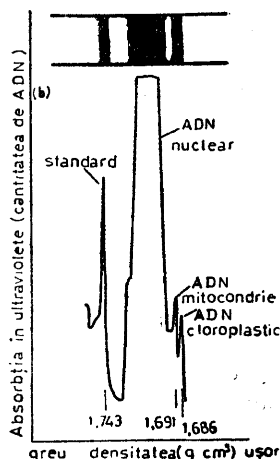


Fig. 37. Fracțiunile de ADN celular de la *Euglena gracilis.* (a) Bandarea care apare în tubul de centrifugă care conține ADN de Euglena gracilis (centru și dreapta) și ADN de fag SP 8 folosit ca standard (stînga). (b) Analiza spectrofotometrică în ultraviolet a benzilor. Banda cu densitatea 1,743 corespunde ADN martor SP 8. Banda principală din centru corespunde ADN nuclear. ADN mitocondrial bandează la 1,691 iar ADN cloroplastic bandează la 1,686 (greutate moleculară $9{,}2 \times 10^6$ daltoni).

mensională de fibrile fine de ADN cu orientare randomizată, avînd un diametru de cca 25 Å. Înseamnă că şi în acest caz este vorba de lipsa asocierii ADN cu histonele.

De regulă ADN extranuclear se prezintă ca molecule circulare bicatenare de ADN, dar şi sub formă de molecule liniare. ADN extranuclear se replică după modelul semiconservativ şi relativ independent de replicarea ADN nuclear avînd echipament enzimatic propriu de replicare şi de transcriere. Organitele celulei eucariote, cloroplastele şi mitocondriile, prezintă un sistem autonom de sinteză proteinică echipament enzimatic propriu cu ribozomi specifici de tip procariot (70 S) şi cu ARN*t* specific. Există însă o strînsă independenţă între funcţionarea genomului nuclear şi a celui cloroplastic sau mitocondrial. ADN mitocondrial este o structură circulară dublucatenară care are o greutate moleculară ce variază între 1×10^7 şi 5×10^7 daltoni. El are o dimensiune mai mare la ciuperci, protiste şi plante superioare. Mamiferele au un genom mitocondrial mic de 1×10^7 daltoni.

La drojdie, ADN mitocondrial are 5×10^7 daltoni ceea ce corespunde la 75 kilobaze. Primele gene care au fost desemnate a codifica componente ale maşinăriei de sinteză proteinică mitocondrială au fost desemnate gene *syn* şi ele includ genele pentru ARN*r* şi ARN*t* mitocondrial (Tzagoloff şi Macino, 1977). La *Saccharomyces cerevisiae* s-au descris cel puţin 30 tipuri diferite de ARN*t* mitocondrial. Numărul total de specii izoacceptoare de ARN*t* este în acord cu ipoteza *wobble* (vezi codul genetic). La *Saccharomyces* nu este necesar importul de ARN*t* citoplasmatic pentru sinteza proteinică pe ribozomi mitocondriali. La *Tetrahymena* însă numai ARN*t* pentru leucină, fenilalanină, triptofan şi tirozină sînt sintetizaţi pe matriţă de ADN mitocondrial, restul fiind importaţi din citoplasmă, avînd origine nucleară. Aminoacil sintetazele mitocondriale, factori de iniţiere a sintezei proteinelor în mitocondrii şi cele mai multe proteine ribozomale sînt produşi ai genelor nucleare sintetizaţi pe ribozomi citoplasmatici.

Mutaţia „poky" de la *Neurospora crassa* apare ca rezultat al absenţei unei proteine specifice a subunităţii ribozomale mici (30 S) a ribozomilor mitocondriali. Această proteină a fost desemnată *var 1* şi este codificată de o genă mitocondrială. A doua clasă importantă de gene mitocondriale a fost desemnată genele *mit* şi codifică proteine ce funcţionează în transportul electronilor şi fosforilarea oxidativă. Mutaţiile *mit* afectează

trei complexe ale membranei interne, citocromoxidaza, coenzima QH_2-citocrom *c*, reductaza și ATP-*aza* oligomicin sensibilă.

Din totalul a nouă proteine sintetizate în mitocondrii șase s-au dovedit a fi specificate de ADN mitocondrial. S-au descris trei grupe de complementație mitocondrială *oxi 1*, *oxi 2* și *oxi 3* care intervin în codificarea subunităților citocromoxidazelor sintetizate în mitocondrii. Mutațiile din grupul de complementație *cob* sînt deficiente în citocromul *b*. Un grup de mutante mitocondriale deficiente în ATP-*ază* desemnate *pho 2* prezintă leziuni în componenta proteolipidică a ATP-*azei*.

La *S. cerevisiae* mutantele citoplasmatice spontane „petite“ prezintă unități genomice mitocondriale în care un segment excizat al genomului parental de tip sălbatic (normal) a fost amplificat în tandem. Acest segment excizat devine unitatea repetată a genomului „petite“. Acest genom „petite“ la rîndul său, deși produsul unui eveniment mutațional poate suferi deleții care duc la genomuri „petite“ secundare, avînd unități repetate mai scurte (Gaillard și colab., 1980). Studiul mutantelor spontane „petite“ arată că în mod frecvent capetele segmentului excizat corespund la secvențe scurte ale genomului de tip sălbatic care sînt extrem de bogate în GC. Astfel, *clusterii* (grupări masive) de GC sînt localizați în segmente lungi bogate in AT. Repetiții de secvențe s-au dovedit a fi prezente atît la nivelul *clusterilor* GC cît și a *spațiatorilor* AT, ceea ce face probabilă posibilitatea ca excizia să se realizeze printr-un mecanism de recombinare nelegitimă cu specificitate de sit, între secvențe omoloage.

Combinarea metodelor de cartare genetică și de cartare fizică a dus la cartarea markerilor *mit*$^-$ și de rezistență la antibiotice din genomul mitocondrial de la *S. cerevisiae*.

Pe calea analizei *co-retenției* și *co-deleției* alelelor mutante în și din ADN mitocondrial al mutantelor *petite* (ϱ^-) și a analizei produșilor de recombinare (analiză genetică) din încrucișări bi- și trifactoriale, s-a stabilit circularitatea hărții genetice mitocondriale, unicul grup de lincaj genic mitocondrial avînd ca suport fizic molecula circulară dublu-catenară de ADN mitocondrial.

Genele ribozomale mitocondriale și pentru ARN*t* mitocondrial au fost cartate prin hibridarea acestor produși cu fragmente de ADN*mt* de la tipul sălbatic și de la tipul ϱ^- (*petite*) generate prin restricție cu endonucleaze de restricție.

Harta genetică mitocondrială evidențiază o considerabilă dispersie a genelor care codifică funcții înrudite. Cele trei gene structurale care codifică citocromoxidaza sînt separate de secvențe care conțin genele *syn* și *mit*.

Genele ARN*r*, ARN*t* și ATP-*azei* sînt de asemenea distribuite împrăștiat în tot genomul mitocondrial. Această distribuție specifică a genelor mitocondriale elimină posibilitatea expresiei lor coordonate controlată prin sinteza unui ARN*m* policistronic, genele mitocondriale, spre deosebire de cele de procariote, apar a fi transcrise individual, caracteristică specifică și genelor nucleare eucariote.

Cloroplastul plantelor superioare conține un număr mare de molecule circulare, identice cu ADN cu o greutate moleculară de cca 9×10^7 daltoni. Fiecare moleculă conține informația genetică totală a organitului (Börner, 1980). Ca urmare, numărul de copii ale fiecărei gene cloroplastice per celulă poate ajunge la cîteva mii, depinzînd de numărul de cloroplaste per celulă și de cel al moleculelor de ADN per cloroplast.

Cu ajutorul endonucleazelor de restricție s-a stabilit harta fizică a genomului cloroplastic și au fost cartate genele pentru ARN*r*, ARN*t*, subunitatea mare a fracțiunii proteinice I și pentru unele polipeptide neidentificate. S-a stabilit că genele ARN*r* sînt localizate în cadrul unor regiuni cu secvențe repetate din ADN (în cadrul a două repetiții inversate la spanac, porumb și *Chlamydomonas* și în cadrul a trei repetiții în tandem mai mici la *Euglena*). Pe ribozomii cloroplastici sînt sintetizate mai mult de 90 polipeptide distincte, incluzînd și subunitatea mare a fracțiunii proteinice I (ce participă în cataliza enzimatică a fotosintezei), trei subunități ale factorului de cuplare CF_1, doi factori de elongație și citocromii. Un număr mare de proteine cloroplastice sînt sintetizate pe ribozomi citoplasmatici și includ enzime ale ciclului Calvin, enzimele sintezei pigmentului ADN polimeraza, polipeptidele *tilacoidelor* și membranele anvelopei cloroplastului. Polipeptidele sînt evident sintetizate în citoplasmă, ca precursori avînd o secvență semnal. Această secvență adițională permite transportul specific prin anvelopa cloroplastului după care este eliminată. În membrana anvelopei cloroplastului se află receptori specifici pentru secvența semnal a moleculelor precursoare, facilitînd trecerile prin membrană.

Recent, au fost izolați *cromozomi cloroplastici* intacți de la alga *Euglena* ca și de la numeroase plante superioare și s-a

constatat că aceştia sînt circulari, avînd o circumferință de cca 45 μm, ceea ce corespunde la cantitatea de ADN de la fagii T_2 sau T_4.

S-a constatat că genele cloroplastice care codifică diferitele enzime sau proteine ce participă în fotosinteză sau în morfogeneza organitului sau genele mitocondriale ai căror produşi dirijează sinteza unor enzime ce intervin în lanțul transportorilor de electroni sau a unor proteine structurale suferă mutație şi recombinare. Ele alcătuiesc ca şi la procariote un singur grup de înlănțuire.

Cercetări de hibridare moleculară au demonstrat lipsa unei omologii între ADN nuclear şi ADN extranuclear. O analogie mai mare apare între ADN extranuclear şi ADN bacterian sau cianobacterian, de unde s-a tras concluzia că organitele celulei eucariote ar fi derivat prin endosimbioza unor strămoşi de tip procariot — bacteriile pentru mitocondrii, cianobacteriile pentru cloroplaste (Gavrilă, 1978). Există şi alternativa ca celula eucariotă să derive prin transformarea progresivă a celulei procariote, organitele citoplasmatice ale celulei eucariote provenind prin transformarea membranelor *tilacoide* şi prin compartimentalizarea genomului inițial în genom nuclear, mitocondrial, cloroplastic etc.

Capitolul IV

CODIFICAREA BIOCHIMICA ŞI EXPRESIA GENICĂ

1. GENERALITĂŢI

Gena reprezintă un segment din macromolecula ADN a cărui secvenţă de nucleotide deţine, sub formă codificată biochimic, informaţia genetică necesară pentru sinteza unei catene polipeptidice. Această informaţie este transmisă în procesul de transcriere unei monocatene ARN care poartă astfel mesajul genetic ce dirijează includerea în catena polipeptidică a aminoacizilor corespunzători. Secvenţa genică codificatoare este precedată de o secvenţă necodificatoare de circa 50 nucleotide care s-a numit regiune *promotor*, reprezentînd situl de ataşare a ARN *polimerazei* în vederea transcrierii. De asemenea în cadrul genei se mai află o regiune implicată în reglarea transcrierii genei şi care a fost numită *regiune operatoare*. Uneori două sau mai multe gene care deţin informaţia genetică ce dirijează sinteza unor enzime ce intervin în aceeaşi cale metabolică pot avea acelaşi promotor şi acelaşi operator. În acest caz asemenea gene sînt transcrise sub forma unui transcript comun care poate fi apoi clivat în diferite catene ARN*m* purtătoare ale mesajului genetic pentru fiecare catenă polipeptidică.

Genele care deţin informaţia genetică pentru sinteza polipeptidelor se numesc *gene structurale*. Transcriptele lor reprezentate de ARN*m* sînt traduse în polipeptide.

Genele care deţin informaţia genetică pentru sinteza ARN*r* se numesc *gene ribozomale*. Transcriptele lor nu sînt traduse.

Conversia (traducerea) mesajului genetic din limbaj de acid nucleic construit din cele patru nucleotide într-un limbaj pro-

teinic, construit din cei 20 aminoacizi principali este mediată de un sistem de codificare-decodificare cunoscut sub numele de *cod* genetic. Această conversie se realizează la nivelul ribozomilor — locul sintezei proteinice — și are loc prin participarea celor trei categorii principale de ARN celular: ARN*m*, ARN*t* și ARN*r*.

Ideea profetică a lui E. Schrödinger din anii 1944—1945 despre natura relației dintre acizii nucleici și proteine formulată în termeni de codificare biochimică s-a dovedit reală și cristalizată sub denumirea *dogmei centrale a biologiei moleculare* elaborată în anul 1956 de către Crick. Dogma centrală a biologiei moleculare a admis transferul unidirecțional al informației genetice ADN → ARN → proteine. Ulterior, descoperirea reverstranscrierii a adus corecții dogmei centrale a biologiei moleculare, demonstrînd posibilitatea unui transfer invers de informație genetică de la ARN la ADN.

2. CODUL GENETIC

Codul genetic reprezintă un sistem biochimic prin care se stabilește relația dintre acizii nucleici și proteine.

Relația dintre mutația unei gene și blocarea unor etape specifice ale unui lanț metabolic la *Neurospora* a fost stabilită înainte de 1944 de către Beadle și Tatum sub formula metaforică: *o genă — o enzimă. Colinearitatea genă — polipeptidă* a fost ulterior demonstrată în numeroase cazuri. Astfel, în 1957 Ingram și Husit au arătat că hemoglobinele de tip *A* și *S* au o structură primară care diferă printr-un singur aminoacid (fig. 38). Hemoglobina *S* este o hemoglobină mutantă. S-a tras concluzia că mutația a alterat poziția nucleotidelor la nivelul genei iar această alterare a fost tradusă printr-o alternare a poziției unui aminoacid în catena polipeptidică. Veridicitatea colinearității nucleotidelor de la nivelul genei cu aminoacizii de la nivelul catenei polipeptidice a fost demonstrată experimental de către Yanofsky în 1964. Analizînd mutanții *auxotrofi* de *E. coli* induși prin iradiere UV, deficienți în proteina *A* a *triptofansintetazei,* proteină care reprezintă o catenă polipeptidică de 267 aminoacizi, autorul a constatat că în poziția 210, mutanta A_{23} are arginina iar mutanta A_{46} are acidul glutamic pe cînd tipul normal prezintă în poziția respectivă glicina. Pe

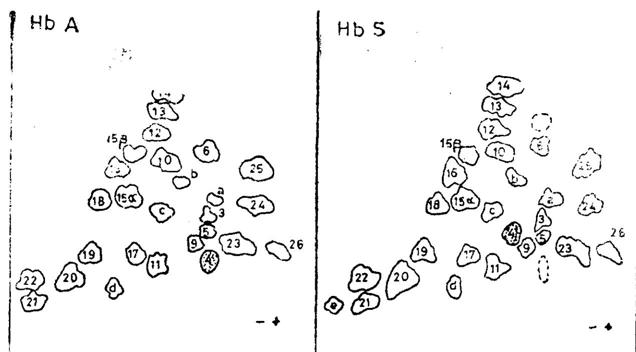


Fig. 38. Comparaţia cromatogramelor peptidelor produse prin digestie cu tripsină a hemoglobinei normale (Hb^A) şi hemoglobinei din celule falciforme (Hb^S) din care reiese modificarea în poziţia peptidei 4.

această bază s-a tras concluzia că o schimbare în secvenţa de nucleotide determină înlocuirea unui aminoacid cu altul, de unde dovada colinearităţii nucleotide — aminoacizi, respectiv o colinearităţii genă—proteină.

În anul 1952 Dounce şi apoi în anul 1954 Gamow, bazaţi pe descoperirea lui Astbury şi Bell din 1938 care au constatat prin cercetări cristalografice că spaţiul dintre nucleotide în ADN este aproximativ egal cu spaţiul dintre aminoacizi în catena polipeptidică, emit ipoteza potrivit căreia secvenţa liniară de nucleotide din ADN determină secvenţa liniară a aminoacizilor din catenele polipeptidice ale moleculelor proteinice.

Gamow a analizat statistic relaţia dintre polinucleotide, reprezentînd cuvinte lungi scrise într-un alfabet cu patru litere (cele patru baze azotate) şi polipeptidice, reprezentînd cuvinte lungi scrise într-un alfabet cu 20 litere (reprezentate de cei 20 aminoacizi principali). Dacă secvenţa de nucleotide din acidul nucleic determină secvenţa de aminoacizi din polipeptidă se pune problema relaţiei dintre cele 4 baze azotate şi cei 20 aminoacizi principali în termeni de determinare cantitativă: cîte baze azotate determină un aminoacid?

Dacă se admite că o singură bază azotată determină (specifică sau codifică) un singur aminoacid atunci în virtutea relaţiei $4^1 = 4$ nu vor putea fi specificaţi decît 4 aminoacizi. Tot astfel combinări de cîte două baze azotate, potrivit relaţiei $4^2 = 16$ sînt insuficiente spre a specifica toţi cei 20 ami-

noacizi principali. Doar combinări de cîte 3 baze azotate ($4^3 = 64$) pot să ofere posibilitatea specificării tuturor celor 20 aminoacizi principali şi să mai rămînă încă şi alte posibilităţi suplimentare de specificare.

Relaţia nucleotide-aminoacid a fost dovedită experimental studiindu-se mutaţiile induse de către acidul nitros la VMT, a cărui capsidă constă din 2150 catene polipeptidice identice, fiecare conţinînd cîte 158 aminoacizi. Mutaţiile induse de către acidul nitros sînt *tranziţii* de tipul A → G sau C → U (vezi mutageneza). În urma apariţiei acestor mutaţii la nivelul nucleotidelor din ARN genetic al VMT, care îndeplineşte şi rol de ARN*m*, apar modificări şi în catena polipeptidică. Aceste modificări sînt de tipul unor substituţii de aminoacizi:

Prolină → Serină → Fenilalanină sau
Prolină → Leucină → Fenilalanină.

S-a dedus că Prolina este specificată de un codon la care cel puţin două nucleotide sînt fie A, fie C. Tranziţia A → G sau C → U a uneia din aceste nucleotide trebuie că generează codonul Serinei, respectiv pe acela al Leucinei. În codonul Fenilalaninei ambele nucleotide trebuie să fie G sau U.

Pe seama unor deducţii asemănătoare şi a analizei variantelor hemoglobinei umane, Nirenberg a descifrat în 1961 codul genetic.

Efectuîndu-se studii genetice asupra mutantelor induse cu proflavină la *bacteriofagul* T_4 s-a demonstrat experimental că unitatea care codifică un aminoacid este tripleta de nucleotide care s-a numit *codon*.

Asemenea studii în care s-au aplicat teste de recombinare cu tipul sălbatic au condus la concluzia că în urma acţiunii proflavinei are loc fie adiţia, fie deleţia de baze din secvenţa polinucleotidică. Astfel, există mutante iniţiale notate convenţional cu „—" şi mutante naturale de reversie notate cu „+".

O secvenţă iniţială, normală de nucleotide va fi citită din trei în trei baze azotate spre a dirija de fiecare dată plasarea în lanţul polipeptidic a unui aminoacid.

Dacă se admite că secvenţa de nucleotide reprezentînd cadrul de citire începe să fie citită dintr-un punct fix, deleţia unei singure perechi de nucleotide va duce la schimbarea tuturor tripletelor, modificînd cadrul de citire şi atunci în catena polipeptidică vor fi incluşi cu totul alţi aminoacizi decît în cazul normal. Are loc citirea greşită a codului. Astfel, dacă cadrul

normal de citire este GACG. GAG. GAG. GAG, inserția unui singur C la nivelul săgeții va determina următorul cadru de citire: GAG. GAC. GGA. GGA. etc. Tot astfel deleția lui A va produce de asemenea schimbarea cadrului de citire GAG. GAG. GAG. GAG și atunci secvența de triplete va fi GAG. GGG. AGG. AGG. etc. În ambele cazuri este schimbat totalmente cadrul de citire mai ales dacă asemenea alterări se produc la începutul genei. Se sintetizează o proteină anormală, mutantă sau nefuncțională.

Dacă în urma mutației, după ce a avut loc inițial o deleție a unei perechi de baze azotate, va avea loc adiția unei alte perechi de baze azotate în porțiuni adiacente ale aceleiași gene se poate restabili ordinea normală a nucleotidelor (se reface cadrul de citire) și ea va fi citită normal. Astfel, considerînd polinucleotida GAG, inserția lui C urmată de deleția lui A va reface cadrul normal de citire, va avea loc o citire corectă a sa și se va sintetiza un polipeptid normal:

GAG. GAG. GGA. GGA. GGG. GAG. GAG...

chiar dacă cîteva triplete pe porțiunea în care se realizează adiția și deleția vor fi modificate. Deleția sau adiția uneia, a două sau a patru perechi de nucleotide nu reface ordinea normală a nucleotidelor respectiv a codonilor și are loc sinteza unei proteine mutante.

În anul 1961 Nirenberg și Matthey pe de o parte și Khorana pe de alta, folosind ARN*m* sintetizați artificial ce conțineau o secvență cunoscută de nucleotide, au reușit să sintetizeze *in vitro* diferite polipeptide în sisteme acelulare care conțineau ribozomi, factori proteinici necesari pentru sinteza polipeptidică precum și tot setul de ARN*t*. S-a analizat apoi compoziția polipeptidelor sintetizate. Astfel cînd au folosit un homopolimer poliribonucleotidic format numai din uracil — (poli U) a fost sintetizată *in vitro* polipeptidul polifenilalanina. Astfel, s-a demonstrat că tripleta UUU specifică aminoacidul fenilalanina. Cînd s-a folosit poli-C s-a sintetizat poliprolina. Poli-A determină sinteza polilizinei. Numai poli-G nu a putut fi verificat inițial căci formează între resturile guanină punți de hidrogen care determină conformații spațiale multicatenare spirale la care ribozomii nu se pot atașa. Ulterior s-a stabilit că GGG codifică glicina. Experiențele de verificare a proprietăților de codificare ale polimerilor au fost continuate luîndu-se în considerare copolimeri. Pe această bază s-a stabilit că poli A-G determină încorporarea lizinei într-o catenă polipeptidică

pe cînd poli C-G determină încorporarea într-o catenă polipeptidică a alaninei, argininei și prolinei. O secvență repetitivă CUCUCU determină sinteza unui polipeptid în care leucina alternează cu serina. Au fost folosiți apoi copolimeri cu 2 baze azotate în proporții diferite și cu 3 baze azotate diferite reușindu-se sinteza de polipeptide artificiale în care erau incluși diverși aminoacizi. Prin asemenea experiențe s-a putut determina direct relația de specificare a aminoacizilor de către nucleotide. Dar prin ele nu se putea stabili ordinea nucleotidelor în cadrul tripletelor. Pentru aceasta a fost sintetizat artificial un ARN*m* alcătuit din două nucleotide diferite dar la care se știa care este ordinea acestor nucleotide. De exemplu s-a construit un ARN*m* artificial de tip UGU-GUG-UGU-GUG etc. și s-a constatat că el dirijează sinteza unui polipeptid în care cisteina alternează cu valina. Pe această cale s-a putut determina experimental ordinea nucleotidelor celor mai multe triplete. Ulterior, pe baza unor tehnici sofisticate care au inclus hidroliza ribonucleazică a ARN*m*, ultracentrifugarea fracționată și electroforeza lizatelor, cromatografia pe hîrtie cu stabilirea *fingerprint*-urilor diferitelor oligonucleotide, analiza spectrofotometrică în ultraviolet și analiza „de vecinătate" prin care se poate stabili poziția radicalilor fosforici s-a putut determina ordinea nucleotidelor în diferitele triplete.

În studiul codificării biochimice a fost aplicată și metoda identificării aminoacizilor — ARN*t* fixați pe ribozomi sub influența unui codon cunoscut. Această metodă ca și celelalte prin care s-a descifrat codul genetic s-au bazat pe constatarea că ionii Mg^{++} în concentrație mare împiedică disocierea ribozomilor 70 *S* în subunitățile sale și permit acestora să inițieze traducerea fără codonul inițiator AUG. Astfel, în 1964, Nirenberg a sintetizat trinucleotide cu secvențe de baze cunoscute, acestea au fost asociate cu ribozomii și s-a urmărit care dintre ARN*t* se leagă la un asemenea complex. De exemplu, trinucleotidul 5′ GCC 3′ legat la ribozom a determinat atașarea la complexul format doar a ARN*t* pentru alanină dintr-un amestec de diferiți ARN*t*. Tot astfel, 5′ GUU 3′ acționînd ca ARN*m*, determină legarea la ribozomi doar a ARN*t* pentru valină. Pe această cale s-a putut stabili direct semnificația de codificare a fiecărui codon. Astfel, s-a rezolvat semnificația de codificare a trei izomeri U_2G: UUG-leucină; UGU-cistenă; GUU valină. Folosind această cale s-a reușit descifrarea în totalitate a codului genetic. Crick a sugerat aranjarea codonilor într-un tabel care să reprezinte grafic codul genetic. Semnificația acestui

tabel pentru Biologie este comparabilă cu aceea a tabelului periodic al elementelor pentru Chimie.

Au fost studiate de asemenea mutațiile care determină substituția unor aminoacizi din molecula unor proteine binecunoscute ca secvență de aminoacizi cum sînt hemoglobina, triptofansintetaza de *E. coli* și proteina VMT.

Mutațiile de substituție afectează de regulă o singură nucleotidă din catena polinucleotidică. O mutație de substituție care apare cu mare frecvență la hemoglobina umană duce la înlocuirea valinei cu izoleucina. Cum valina este codificată de GUU iar izoleucina de 1 A 2U s-a tras concluzia că ordinea nucleotidelor în tripleta izoleucinei este AUU, codonul valinei devenind prin substituția G cu A codonul izoleucinei. Printr-o analiză de acest fel s-au putut dovedi experimental raporturile de codificare și s-a descifrat codul genetic (fig. 39). Cea mai neambiguă validare a codului genetic stabilit prin experiențe

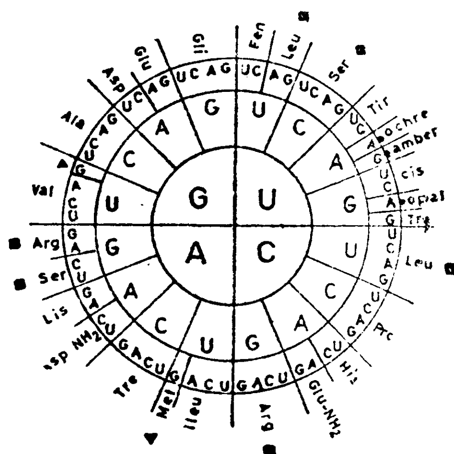


Fig. 39. Reprezentarea codului genetic ARN*m*. Codonii se formează pornind din centru spre periferie. La periferia cercului sînt dispuși aminoacizii codificați de codonii corespunzători. *Ala* = alanina; *Arg* = arginină; *Asp* = acid aspartic; *Asp*—NH_2 = asparagina; *Cys* = cisteina; *Glu* = acid glutamic; *Glu*—NH_2 = glutamina; *Gly* = glicina; *Met* = metionina; *Phe* = fenilalanina; *Pro* = prolina; *Ser* = serina; *Thr* = treonina; *Try* = triptofan; *Tyr* = tirozina; *Val* = valina. Codonii *ocru*, *amber* și *opal* desemnați cu un cerc negru sînt codonii nonsens, care nu specifică nici un aminoacid, reprezentînd codoni terminatori ai catenei polipeptidice. Codonii desemnați cu un triunghi sînt codoni inițiatori ai catenei (AUG și GUG). Cu un pătrat sînt desemnați aminoacizii codificați de codoni diferiți care se deosebesc după prima bază.

Fig. 40. Un fragment din ARN*m* de R_{17} cu codonii care specifică diferiţi aminoacizi dintr-un fragment al proteinei interne a capsidei. Secvenţa de nucleotide din ARN*m* R_{17} ca şi cea de aminoacizi din proteina capsidei au fost însă total stabilite, remarcîndu-se colinearitatea nucleotide-aminoacizi şi în acelaşi timp veridicitatea codonilor stabiliţi prin experienţe indirecte (după Goodenough & Levine, 1974).

in vitro a fost realizată prin compararea secvenţei de aminoacizi din proteina capsidei fagului R_{17} cu secvenţa de nucleotide a ARN*m* de R_{17} în regiunea moleculei care dictează sinteza proteinei capsidei.

Secvenţa teoretică, stabilită prin experienţe *in vitro* s-a constatat a corespunde exact cu secvenţa de aminoacizi din proteina capsidei (fig. 40.)

3. CARACTERISTICILE CODULUI GENETIC

Sînt posibili 64 de codoni sau triplete potrivit relaţiei $4^3 = 64$. Dintre aceştia doi sînt codonii de iniţiere şi anume AUG şi GUG, care marchează începutul unei catene polipeptidice. Ei determină iniţierea catenei polipeptidice prin încorporarea formilmetioninei la *E. coli* şi metioninei la eucariote. Alţi trei codoni nu codifică nici un aminoacid (sînt codoni

nonsens), ei indicînd însă sfîrşitul unei catene polipeptidice (*codoni stop*). Aceştia sînt codonii *ocru* = UAA, *ambră* = UAG şi *azur* = UGA. Codonul UGA separă genele în cadrul unui mesaj genetic policistronic.

Codul genetic are cinci caracteristici esenţiale: este universal, neacoperit, fără virgule, degenerat şi ambiguu.

Caracterul de universalitate al codului genetic ne arată că un anumit codon codifică un acelaşi aminoacid la orice organism, indiferent de treapta evolutivă pe care se află, de la virusuri pînă la om. Prin mutaţie codul genetic nu se schimbă; este schimbată informaţia ereditară, iar în traducerea acesteia într-o proteină mutantă funcţionează acelaşi cod care funcţionează şi în traducerea informaţiei ereditare normale de la tipul normal (sălbatic).

Universalitatea codului genetic a fost demonstrată experimental în cazul sintezei proteinice desfăşurate în sisteme acelulare provenite de la bacterii şi mamifere sub influenţa unui aceluiaşi ARN*m* sintetizat artificial, cînd se obţin aceleaşi proteine, indiferent dacă sistemul acelular este provenit de la bacterie sau de la mamifer. Hemoglobina de iepure a putut fi sintetizată artificial folosindu-se ribozomii şi ARN*m* din reticulocite de iepure şi ARN*t* de *E. coli*. Experienţele de inginerie genetică (prin care gene de la mamifer pentru insulină, pentru hemoglobină, pentru hormonul de creştere, pentru *angiotensină II* precum şi gene ribozomale sau pentru histonă de la arici de mare şi drosofilă au fost introduse în celula bacteriană *E. coli*) au arătat că poate fi dirijată sinteza de produşi genici specifici eucariotelor, folosindu-se aparatul bacterian de traducere — ribozomul. Este dovada clară a universalităţii codului genetic. Dar, probabil cea mai evidentă demonstrare a universalităţii codului genetic a fost realizată de J. Gurdon, care a purificat ARN*m* pentru hemoglobină din reticulocite de iepure şi l-a injectat în ovocite de broască unde aparatul de sinteză proteinică, de traducere a mesajului genetic al broaştei sintetizează hemoglobină stabilă de iepure, chiar dacă celulele ovocitare nu sintetizează niciodată hemoglobină. Mesajul genetic al oricărui sistem biologic poate fi tradus de maşinăria de traducere a oricărui alt sistem biologic. Codul genetic este deci universal.

Neacoperirea codonilor. Codonii succesivi, vecini, în care se organizează o secvenţă de nucleotide a unei gene ce specifică o proteină dată nu se acoperă, nu-şi împrumută nucleotide, nu au nici o nucleotidă comună. Ei reprezintă unităţi de codi-

ficare de sine stătătoare, nesuprapuse. De asemenea, între sfîrşitul unui codon şi începutul codonului următor nu există spaţii sau nucleotide. Codul genetic este aşadar fără virgule, lipsind semnalele speciale care să marcheze sfîrşitul unui codon şi începutul codonului următor. La fagul φ X 174 gene diferite, adiacente însă îşi împrumută nucleotide sau codoni fără însă ca aceştia să se suprapună.

Două caracteristici ale codonului genetic sînt foarte importante în traducerea mesajului genetic. Este vorba de *degenerarea* şi *ambiguitatea* codului genetic.

Caracterul de degenerare a codului genetic ne arată că în unele cazuri un acelaşi aminoacid este specificat de mai mulţi codoni. Astfel, fenilalanina este specificată de UUU dar şi de UUC. Serina este specificată de 6 codoni: UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC. Tot astfel leucina este codificată de 6 codoni: UUA, UUG, CUA, CUC, CUU, CUG. Dar codonii în care predominantă este guanina (ce determină apariţia de structuri secundare) sînt de regulă ineficienţi în biosinteza proteinică. Diferiţii codoni care au însă primele două nucleotide identice pot specifica acelaşi aminoacid. Şi aminoacidul arginină este codificat de 6 triplete. Numai metionina şi triptofanul sînt codificaţi de cîte un singur codon (AUG respectiv UGG).

Ambiguitatea codului genetic este redusă. Ambiguitatea înseamnă recunoaşterea de către anticodonul dintr-un ARN*t* a mai multor codoni din ARN*m* şi deci posibilitatea ca un codon să specifice mai mulţi aminoacizi. Astfel codonul AUG este recunocut atît de către anticodonul lui $ARNt^{met}$ (cînd este în interiorul mesajului — cadrului de citire) cît şi anticodonul lui $ARNt^{fmet}$ (cînd este la începutul cadrului de citire). Tot la fel, codonul GUG poate specifica atît formilmetionina cînd este la începutul cadrului de citire cît şi valina cînd este în interiorul mesajului.

Aminoacizii cu proprietăţi structurale similare au tendinţa de a avea codoni înrudiţi. Aşa se face că acidul aspartic şi acidul glutamic prezintă codoni similari GAU şi GAC în primul caz, respectiv GAA şi GAG în al doilea caz. Tot astfel aminoacizii aromatici fenilalanina, tirozina şi triptofanul sînt codificaţi de triplete care încep cu U. Se admite că această proprietate de codificare a fost stabilită în decursul evoluţiei, ea prezentînd avantaje evolutive căci înlocuirea prin mutaţie a unui aminoacid cu altul în catena polipeptidică este cu atît mai puţin dăunătoare cu cît aminoacizii înlocuiţi au proprietăţi

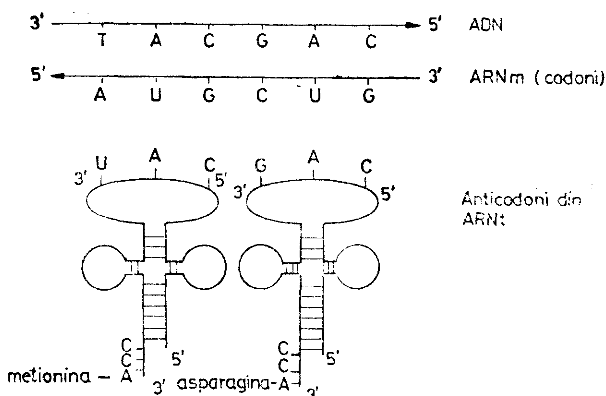


Fig. 41. Decodificarea informației ereditare (complementaritatea și antipolaritatea tripletelor din ADN, codonilor din ARN*m* și a anticodonilor din ARN*t*).

mai asemănătoare, ceea ce face ca proteina mutantă să poată fi încă funcțională.

Crick a elaborat *ipoteza oscilării (wobble)* spre a explica ambiguitatea. Astfel, U aflat în poziția a 3-a în tripleta anticodonului, la capătul 5′ al acestuia se poate împerechea atît cu A cît și cu G. Astfel, primele două nucleotide sînt cele mai semnificative și mai exacte în codificare, pe cînd cea de-a treia bază a codonului este oscilantă. Flexibilitatea celei de-a treia baze a unui codon a prezentat de asemenea avantaje selective minimalizînd consecințele erorilor.

În cadrul interacțiunii codon-anticodon (fig. 41) interacționează mai întîi nucleotida capătului 5′ al codonului cu nucleotida capătului 3′ al anticodonului. În al doilea rînd interacționează nucleotidele plasate la mijlocul codonului și anticodonului. După Crick, se admite că, odată împerecheate primele două baze, cea de-a treia bază din codon și anticodon prezintă o oarecare oscilație în împerechere. Astfel baza purinică *inosina* (I) care prezintă proprietăți structurale asemănătoare guaninei se află în unii anticodoni și se poate împerechea în mod normal cu citozina (C) din codonul ARN*m*. Cînd însă I ocupă poziția a treia în anticodon ea se poate împerechea cu U sau cu A aflate în poziția a treia în codonul ARN*m*. Asemenea împerecheri de baze se numesc perechi de *baze oscilante* (wobble). O moleculă de ARN*t* ce are atașată serina și avînd anticodonul

3'—AGI—5' va interacționa cu codonii ARN*m* pentru serină UCC, UCU, și UCA. Tot astfel U plasat în poziția a treia în anticodon se poate împerechea atît cu A cît și cu G plasați în poziția a treia în codonul ARN*m*.

Regulile „wobble" pentru împerecherea codon-anticodon atestă existența a numai 54 anticodoni care să se împerecheze cu 61 codoni deoarece baza *A* nu se află niciodată în prima poziție a anticodonilor. Absența lui *A* din prima poziție a tuturor anticodonilor cunoscuți se crede că este rezultatul acțiunii *dezaminazei* anticodonale care schimbă adenina la hipoxantină, anticodonii care încep cu inozina (I) fiind caracteristici aminoacizilor care sînt codificați de mai mult de doi codoni așa cum este valina (Jukes, 1977). Absența unui anticodon IAA pentru fenilalanină se explică prin eliminarea sa din cauza letalității căci s-ar putea „împerechea greșit" cu UUA (leucină) și cu alți codoni ce specifică cu totul alți aminoacizi. Jukes apreciază că mai curînd dezaminarea anticodonului și nu „oscilarea" explică de ce nu se întîlnesc 61 tipuri de ARN*t*.

Unii anticodoni din moleculele ARN*t* conțin baze modificate în poziția I, altele decît hipoxantina. Asemenea modificări măresc oscilarea codon-anticodon fără însă a genera ambiguitate în încorporarea aminoacizilor în timpul sintezei polipeptidice.

Evoluția codului. Universalitatea codului genetic la organismele actuale este un indiciu pe de o parte a vechimii sale, iar pe de alta că el a rămas neschimbat în cursul evoluției. S-au emis două ipoteze care ar explica aceste aspecte: ipoteza stereochimică și ipoteza accidentului înghețat.

Ipoteza stereochimică admite existența unei relații sterice dintre codon, respectiv anticodon și aminoacidul specificat. Stabilitatea evolutivă a codului ca și structura sa au derivat din stereochimia preordonată a elementelor sale.

Ipoteza accidentului înghețat admite că structura codului genetic a evoluat prin hazard dar, din momentul în care în celula ancestrală comună tuturor formelor prezente actuale au fost stabilite relațiile exacte de codificare, acestea au devenit vitale, încît o evoluție ulterioară a codului a devenit imposibilă. Orice mutație în relațiile de codificare a devenit letală pentru individul biologic la care aceasta a apărut.

Prima ipoteză nu este probată de experiențele în care alanina atașată la ARN*t* pentru cisteină a fost inclusă în catena polipeptidică în locul cisteinei. Aceasta arată că aminoacidul nu este „văzut" de codonul din ARN*m* în etapa de asamblare a polipeptidului. Sînt date care arată că aminoacidul nu este re-

cunoscut de către anticodon în etapa de activare a aminoacidului. Este însă foarte probabil ca asemenea relații stereochimice să fi fost de mare importanță în etapa timpurie a istoriei vieții înainte chiar de apariția *aminoacil*-ARN*t* *sintetazelor*, care au înaltă specificitate ca și înainte de apariția însăși a adaptorului ARN*t*. Sinteza proteinică la început, după Crick și Woese a fost un proces imprecis, desfășurat cu un grad scăzut de specificitate funcțională, în proteinele protoorganismelor putînd intra oricare dintre aminoacizii unui grup care sînt similari structural. De exemplu, unul și același codon ar fi putut specifica alanina și glicina, altul treonina și serina. În codonii tripleți ambigui primitivi numai primele două nucleotide participă în realitate în procesul de recunoaștere. Ulterior, cea de a treia nucleotidă a fost inclusă în procesul de recunoaștere deși la un nivel mai scăzut de specificitate decît cea admisă prin ipoteza oscilării.

Ipoteza accidentului înghețat este pe de o parte dificil de respins și pe de altă parte greu de sprijinit cu date actuale.

4. BIOSINTEZA PROTEINICĂ.

Proteinele joacă un rol cheie în metabolismul celular. Însăși funcția materialului ereditar este condiționată de funcționarea proteinelor cu rol enzimatic sau structural. Enzimele participă la replicarea ADN și ARN, la transcrierea genetică etc. Proteinele structurale intră în structura cromatinei, în componența membranelor, a altor componente celulare și participă la asamblarea însăși a ribozomilor. Toate reacțiile chimice din celulă sînt catalizate de regulă de enzime. Enzimele — proteine tipice — participă în însăși sinteza proteinică. Astfel, cîteva sute de molecule de diferite proteine sînt necesare pentru sinteza unui singur lanț polipeptidic. Este o reînnoită povară pentru celulă să sintetizeze o catenă polipeptidică, dar ea este cerută de o traducere exactă a mesajului genetic.

Proteinele sînt polimeri de aminoacizi.

Toți aminoacizii, cu excepția prolinei, au o structură de bază comună, prezentînd un radical *R*, o grupare *COOH* și o grupare NH_2. Prolina are doar gruparea COOH și un atom de N inclus in radical. Unii aminoacizi sînt bazici (lizina, arginina și histidina). Lizina poartă un rest NH_2 în cadrul radicalului.

Acest rest are tendința de a accepta protoni devenind $—NH_3^+$. Alți aminoacizi sînt acizi purtînd la nivelul radicalului resturi COOH care au tendința de a pierde protoni. Există și aminoacizi aromatici care prezintă inele nesaturate de carbon în radicalii lor. Doi aminoacizi poartă un atom de sulf în radical (cisteina, metionina).

Legarea aminoacizilor între ei (polimerizarea) se face în urma interacțiunii grupului $\alpha—NH_2$ al unui aminoacid cu grupul α—COOH al celui de-al doilea aminoacid cu eliberarea unei



molecule de apă. Se formează o legătură peptidică A—C—N—. Prin polimerizarea aminoacizilor rezultă o catenă polipeptidică care are un schelet de N și C sub formă de zig-zag analog scheletului glucido-fosforic al catenei polinucleotidice cu radicalii R proiectați în afară într-o manieră alternativă.

Distribuirea liniară a aminoacizilor în catena polipeptidică reprezintă structura primară a polipeptidei considerată. În anumite condiții fiziologice, de temperatură sau de pH are loc interacțiunea diferiților aminoacizi din catena polipeptidică prin intermediul unor punți de H, al unor legături bisulfidice (S—S) ducînd la configurații spațiale bi- sau tridimensionale. Prin punți de hidrogen dintre aminoacizi vecini rezultă o structură secundară regulată numită configurația α-helix, al cărei model a fost elaborat pentru prima dată de către L. Pauling înainte de 1940.

Proteinele pot fi alcătuite dintr-o singură catenă polipeptidică (mioglobina, histonele, ADN-polimeraza etc.) sau din 2, 3 sau *n* catene polipeptidice în care caz ele prezintă o structură cuaternară. Astfel, hemoglobina este alcătuită din patru catene polipeptidice separate numite globine, două catene α și două catene β, asociate într-un mod complex. ARN polimeraza de *E. coli* este o proteină oligomerică alcătuită din 6 subunități polipeptidice.

4.1. DESFĂȘURAREA PROCESULUI DE BIOSINTEZĂ PROTEINICĂ

Ribozomii joacă un rol esențial în biosinteza proteinică, adică în decodificarea informației genetice. Ei condiționează interacțiunea specifică *codon-anticodon*, fapt evidențiat prin ex-

perienţe în care s-a urmărit acţiunea streptomicinei. S-a constatat că acest antibiotic poate altera procesul de decodificare a ARN*m*. Streptomicina reduce de trei ori rata de încorporare a fenilalaninei în polifenilalanină cînd se foloseşte un sistem acelular de sinteză proteinică în care în calitate de ARN*m* este utilizat *poli-U*. Reducerea ratei de încorporare a fenilalaninei este însă însoţită de încorporarea leucinei (CUU), izoleucinei (AUU), tirozinei (UAU) şi serinei (UCU). Concluzia este că prezenţa streptomicinei permite altor tipuri de ARN*t*, altele decît ARN*t* legitim pentru fenilalanină să răspundă la codonii UUU în traducerea ARN*m* *poli*-U. Citirea greşită a codului genetic este determinată de interacţiunea streptomicinei cu ribozomii din amestecul de reacţie a sistemului acelular de sinteză proteinică. Situl de acţiune al streptomicinei este subunitatea ribozomală 30 *S*, fapt dovedit de experienţe de asamblare a particulelor ribozomale din subunităţi 30 S de la tipul mutant rezistent la streptomicină şi subunităţi 50 *S* de la tipul normal sensibil. Asemenea ribozomi sub acţiunea streptomicinei nu condiţionează o citire greşită a mesagerului genetic. Nomura a efectuat experienţe de disociere a subunităţilor 30 *S* extrase de la bacterii rezistente şi de la bacterii sensibile la streptomicină şi a separat proteinele ribozomale din această subunitate (21 proteine ribozomale *S*) prin electroforeză. După aceea a reconstituit subunităţi ribozomale 30 *S* prin amestecarea de variate combinaţii ale celor 21 de proteine ribozomale *S* cu molecule de ARN*r* 16 *S*. Subunităţile 30 *S* reconstituite au fost amestecate cu subunităţi 50 *S* şi au rezultat ribozomi care au fost folosiţi în sisteme acelulare de sinteză proteinică. Nomura a constatat că sensibilitatea sau rezistenţa ribozomilor reconstituiţi la citirea greşită indusă de streptomicină a mesajului genetic conţinut de ARN*m* depinde în întregime de faptul dacă o singură proteină ribozomală *S*, şi anume proteina ribozomală S_{12}, derivă de la subunităţi 30 *S* ale bacteriilor streptomicinosensibile sau streptomicino rezistente. La formele sensibile la streptomicină, acest antibiotic se combină cu două situri din ARN*r* 16 *S* blocînd sinteza proteinică. Tulpinele bacteriene rezistente la streptomicină au proteina S_{12} modificată, ceea ce face să fie ascunse cele două situri de legare a streptomicinei. Dovada suplimentară că proteina ribozomală S_{12} participă în procesul de recunoaştere codon-anticodon a fost adusă de constatarea că unii supresori nonsens care sînt eficienţi la tipul sălbatic, normal streptomicino-sensibil sînt ineficienţi la mutanţii streptomicino-rezistenţi. Secvenţierea aminoacizilor pro-

teinei ribozomale S_{12} a evidențiat faptul că la tipul streptomicino-rezistent apar substituții de aminoacizi în pozițiile 42 sau 87. Iată deci că o simplă substituție de aminoacizi în catena polipeptidică S_{12} interferă cu fidelitatea cu care codonii ARN*m* sînt împerecheați cu anticodonii ARN*t* în procesul decodificării mesajului genetic. Desfășurarea procesului de biosinteză proteinică presupune inițierea, alungirea și terminarea catenei ca și în cazul sintezei polinucleotidelor.

4.1.1. *INIȚIEREA CATENEI POLIPEPTIDICE*

Catena polipeptidică este sintetizată treptat începînd cu un aminoacid N-terminal și terminînd cu un aminoacid C-terminal. ARN*m* care poartă mesajul pentru sinteza unei catene polipeptidice și care deci dictează secvența de aminoacizi a acesteia este citit stadial de către aparatul de sinteză proteinică, cîte un codon la fiecare moment, începînd de la capătul 5′ spre capătul 3′, fiecare codon fiind recunoscut de către anticodonul corespunzător din ARN*t*, acesta din urmă purtînd un aminoacid corespunzător codonului din ARN*m*. Zamecnik și Hoagland au ajuns la concluzia că prima etapă în biosinteza proteinică este activarea aminoacizilor cu ATP catalizată de către enzime *aminoacilsintetaze* specifice fiecărui aminoacid. Aceste enzime au fost descoperite de către Paul Berg de la Standford University. Ele se mai numesc *amino-acil*-ARN*t-sintetaze* și reprezintă factorii celulari care „cunosc" codul genetic, deși însăși secvența lor de aminoacizi este codificată în ADN.

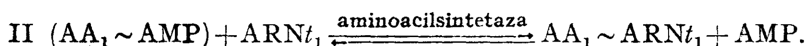
Aminoacizii nu se atașează direct la matrițele ARN*m* ci prin intermediul ARN*t* care reprezintă o *moleculă adaptoare* de racordare specifică, recunoașterea codon-anticodon avînd loc pe principiul împerecherii de baze complementare cu formare de punți temporare de hidrogen. Atașarea aminoacidului la adaptor este catalizată de enzima *aminoacilsintetază* care folosește energia rezultată prin hidroliza ATP. Enzima se atașează la gruparea laterală a aminoacidului (fiecare aminoacid are enzima sa specifică de activare) și la molecula adaptorului (bucla a patra a dihidrouracilului). Aminoacidul (AA) se combină la început cu ATP. Între fosfatul din AMP și grupul carbonil al aminoacidului se realizează o legătură (—P—O—C—) stabilă, rezultînd produsul intermediar AA ~ AMP. Acesta se leagă ferm de enzima activatoare pînă ce se întîlnește cu o moleculă

de ARN*t* specifică, corespunzătoare aminoacidului respectiv. Între riboza adenozinei terminale a grupării CCA de la capătul 3′ al ARN*t* şi gruparea carboxilică a aminoacidului se stabileşte — sub cataliza aceleiaşi enzime aminoacilsintetaza — o legătură covalentă, macroergică. Energia pusă la dispoziţia acestei legături de către ATP va fi folosită în formarea legăturii peptidice.

Evenimentele de activare a aminoacidului pot fi astfel reprezentate:



$$\text{I}\ AA_1 + ATP \xrightleftharpoons{\text{aminoacilsintetaza}} (AA_1 \sim AMP)E_1 + (P)\sim(P).$$



$$\text{II}\ (AA_1 \sim AMP) + ARNt_1 \xrightleftharpoons{\text{aminoacilsintetaza}} AA_1 \sim ARNt_1 + AMP.$$

Legătura AA — ARN*t* de tip (—C—O—C—) se stabileşte între riboza acidului adenilic terminal al grupării CCA-3′ şi grupul carbonil al aminoacidului. Iată de ce aminoacidul nu trebuie să ajungă niciodată pe matriţa ARN*m*. El trebuie numai să se ataşeze corect la un ARN*t* corespunzător lui. Dacă are loc ataşarea greşită a unui aminoacid la un ARN*t* care nu îi este specific (de exemplu prolina se ataşează la ARN*t* pentru fenilalanină) intervine ARN*t sintetaza* pentru fenilalanină care face ca prin hidroliză prolina să fie eliminată. Aminoacil-ARN*t sintetaza* este la rîndul său recunoscută (sau recunoaşte) bucla dihidrouracil a ARN*t*, care este diferită la diferitele tipuri de ARN*t* de unde şi explicaţia specificităţii *aminoacil*-ARN*t-sintetază*-ARN*t*.

Deşi există mai multe tipuri de ARN*t* pentru un acelaşi aminoacid, din cîte se cunoaşte pînă acum există doar o singură *aminoacil*-ARN*t sintetază* pentru fiecare aminoacid.

Aminoacilarea ARN*t* catalizată de aceste enzime trebuie să fie controlată cu extraordinară precizie căci o încărcare greşită a unui ARN*t* cu un aminoacid necorespunzător lui are aceeaşi valoare ca mutaţia, fiind inserat în catena polipeptidică în creştere un aminoacid greşit (Schimmel, 1979). A devenit astfel clar că ARN*t* este implicat în reglarea expresiei genice căci concentraţia de aminoacil-ARN*t* serveşte ca semnal pentru intrarea sau scoaterea din funcţiune a diferitelor gene, intervenind în transcrierea genică la un sit dintre promotor şi prima genă structurală (vezi reglajul genetic). Deoarece sinte-

tazele catalizează aminoacilarea ARN*t* ele sînt direct sau indirect implicate în reglarea expresiei anumitor gene.

Atașarea unui aminoacid la ARN*t* specific este evenimentul în cursul căruia informația din acidul nucleic este confruntată cu aminoacidul pentru prima dată.

Problema recunoașterii aminoacid-ARN*t* este încă departe de a fi clarificată. Ea este însă extrem de precisă de vreme ce schimbarea numai a unei baze azotate din secvența ARN*t* afectează proprietățile de recunoaștere ale acestuia.

Bucla GTΨCG a ARN*t* se împerechează prin baze cu o secvență complementară din ARN*r* 5 *S* și aceasta pare a fi regiunea responsabilă pentru atașarea la ribozom a ARN*t* încărcat cu aminoacidul activat. Lungimea constantă de la capătul —CCA 3′ al ARN*t* la bucla opusă a frunzei de trifoi se presupune a fi în legătură cu poziționarea corectă a aminoacizilor în vederea formării punților peptidice.

A treia etapă în inițierea sintezei proteinice se desfășoară pe ribozom. Acesta are suprafețe specifice de legare stereochimică corespunzătoare a ARN*m*, a AA—ARN*t* și a lanțului polipeptidic în creștere. Ribozomul asigură de așa manieră asocierea acestor elemente astfel încît anticodonul să poată recunoaște codonul corespunzător ducînd astfel la o corectă descifrare a mesajului genetic. Nu se știe exact care din componentele ribozomale (proteine ribozomale sau ARN*r*) îndeplinește rolul esențial în înlesnirea apoziției corecte a ARN*m* și a ARN*t*, dar recent s-a stabilit că proteina ribozomală contractilă S_1 are capacitatea de a determina deplierea ARN*m* în vederea interacțiunii sale cu ribozomii, legînd apoi ARN*m* la subunitatea 30 *S* (Blumenthal și Carmichael, 1979). Ea se leagă în ribozom la capătul 3′ al ARN*r* 16 *S*, dar în ribozomi activi ea se află la un sit diferit. Avînd o greutate moleculară mică (70.000 daltoni) se admite că proteina S_1 funcționează în conformație alungită.

Descifrarea mesajului genetic determină traducerea sa într-o secvență de aminoacizi asamblați într-o catenă polipeptidică. Înainte de a începe sinteza polipeptidului ribozomul se disociază în subunitățile sale sub acțiunea factorului de inițiere IF_3. În cadrul formării complexului de inițiere ARN*m* se leagă de subunitatea ribozomală 30 *S* prin secvența sa *leader* care nu este tradusă. Apoi are loc asamblarea particulei ribozomale funcționale prin atașarea subunității ribozomale mari 50 *S*.

Aminoacil-ARN*t* se asociază cu subunitatea 50 *S* a ribozomului. Subunitatea 50 *S* are două situri: unul a fost desemnat

situl *aminoacil (A)* și în el pătrunde aminoacil-ARN*t* corespunzător codonului din ARN*m* recunoscut prin anticodonul din ARN*t* și al doilea sit a fost desemnat situl *peptidil (P)* care acceptă moleculele de ARN*t* numai dacă au trecut prin situl aminoacil (complexul aminoacil-ARN*t* trecut prin *situl A* suferă probabil modificări conformaționale care permit acceptarea sa în *situl P*). Inițierea propriu-zisă a catenei polipeptidice are loc atunci cînd *situl A* al unui ribozom expune reacției de recunoaștere codon-anticodon acel codon de inițiere AUG din ARN*m*. Acest codon de inițiere corespunde primului aminoacid din catena polipeptidică. *Situl A* este ocupat în inițiere de un *ARN*t pentru formilmetionină la procariote sau metionină la eucariote, care prin anticodonul său 3′ UAC 5′ recunoaște codonul inițiator 5′ AUG 3′ din ARN*m*. Acest ARNt are atașat aminoacidul formilmetionină respectiv metionină. După recunoașterea codon-anticodon, ARN*t* care are atașat primul aminoacid al catenei polipeptidice se deplasează în *situl P*, mișcare realizată prin înaintarea ARN*m* prin ribozom sau invers, prin înaintarea ribozomului pe ARN*m* (mișcare de translație), ceea ce face ca situl aminoacil să vină în dreptul următorului codon din ARN*m*. Se înțelege că mișcarea de translație se face de fiecare dată pe o distanță ce corespunde la un codon.

Toate catenele polipeptidice încep cu aminoacidul metionină. La procariote toate catenele polipeptidice încep cu N-formilmetionina care este astfel un aminoacid blocat de grupul formil. După sinteza polipeptidei, gruparea formil poate fi eliminată. Metionina este specificată de codonul 5′—AUG—3′ din ARN*m*, recunoscut de anticodonul din ARNt^{met} și acest ARNt^{met} este un ARN*t* de inițiere.

Principiul citirii codonului de către anticodon este următorul: dacă un codon din ARN*m* este 5′—UUG—3′ el va fi recunoscut de către un anticodon din ARN*t* scris în direcția inversă adică 3′—AAC—5′.

Atît metionina cît și formilmetionina au ca anticodon 5′—CAU—3′ care se va împerechea cu codonul 5′—AUG—3′ și acest codon AUG reprezintă codon de inițiere. Deși codonul AUG poate fi localizat și în interiorul monocatenei ARN*m*, ARN*t* de inițiere (*i*ARNt^{met}) are afinitate numai pentru codonul AUG localizat la capătul monocatenei ARN*m*, sau acest codon de inițiere este dispus pe un segment din ARN*m* cu o structură secundară proeminentă de tip buclă *(hairpin)*.

În cadrul inițierii (fig. 42) evenimentele se derulează astfel: o subunitate ribozomală mică interacționează cu un codon de

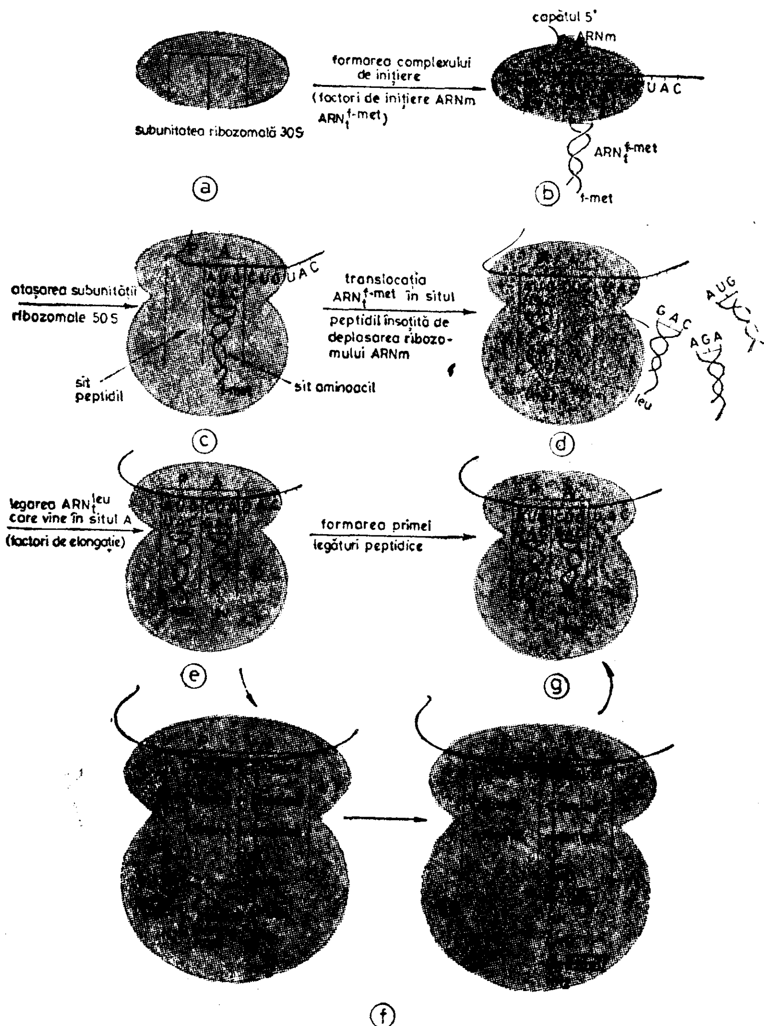
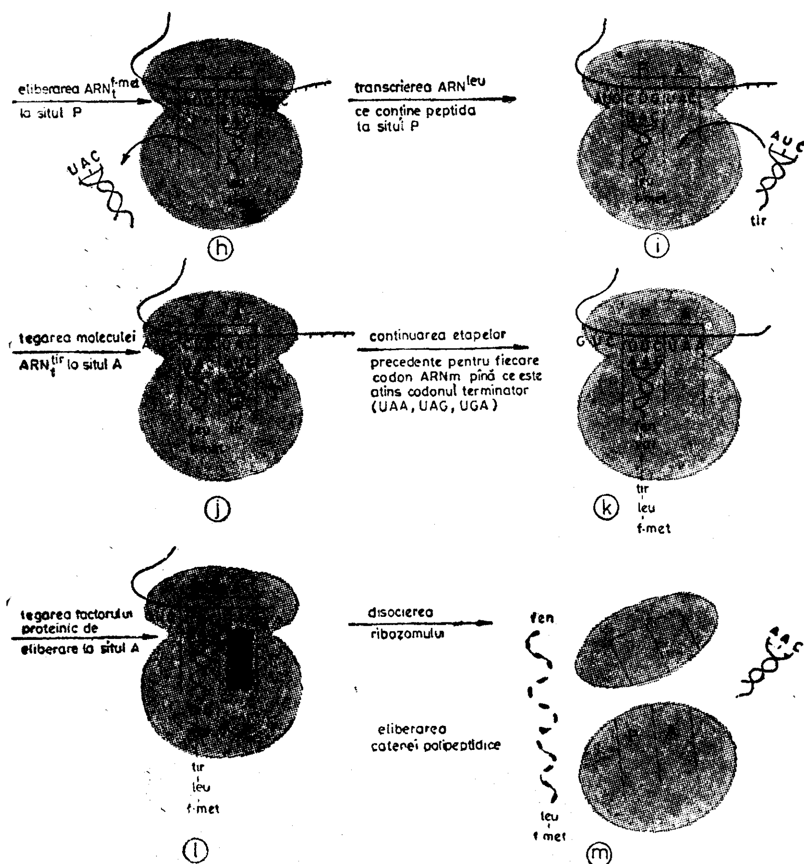


Fig. 42. Schema sintezei proteinice. Decodificarea mesajului genetic începe cu citirea codonului de inițiere AUG de către ARN$_t^{f\text{-}met}$ și se termină cu codonul de terminare UAA. Codonul AUG în mod obișnuit nu este plasat exact la capătul 5' al ARNm, ci el este precedat de un număr de alte nucleotide, dar el ocupă o poziție specifică pe catena ARN*m* putînd fi recunoscut. Tot astfel codonul terminator UAA nu este în mod obligatoriu ultimul codon din macromolecula ARN*m*. Uneori aceeași moleculă ARN*m* posedă mai mulți codoni de inițiere și codoni terminatori condiționînd sinteza mai multor catene polipeptidice. În cazul



ARN*m* care specifică proteinele triptofansintetazei la E. coli, codonul de terminare pentru gena trp B este parțial folosit drept codon de inițiere pentru gena trp A (UGA*UG*). Transferarea aminoacil-ARN*t* din situl A în situl P este însoțită de s schimbarea conformației spațiale a moleculei sale (după Strickberger, 1976).

inițiere AUG și cu un *i*ARNt^{met}, care poartă deci metionina. Se formează un complex *metionil-i-*ARN$_t^{met}$ *AUG* numit *complex de inițiere*. Formarea complexului de inițiere implică intervenția a trei factori proteinici de inițiere care au fost desemnați IF_1, IF_2 și IF_3. Rolul exact al acestor factori nu este cunoscut. IF_3 împiedică asocierea subunităților ribozomale 30 *S* și 50 *S*, cînd ribozomul nu este angajat în sinteza proteinică. Energia ne-

cesară în inițiere este eliberată prin hidroliza unei molecule de GTP care este și ea considerată factor de inițiere atunci cînd se leagă la *f*met-ARN*t* fără a fi hidrolizat. Complexul de inițiere se asociază apoi cu o subunitate ribozomală mare (reacție care necesită potasiu), rezultînd ribozomul funcțional (70 *S* la procariote și 80 *S* la eucariote). Din asocierea ARN*r*—ARN*m* se delimitează în subunitatea mare a ribozomului două situri *aminoacil* (*A*) și *peptidil* (*P*). În momentul asamblării particulei ribozomale funcționale ARN*m* este reținut într-o adîncitură rezultată din poziția celor două subunități ribozomale. ARN*m* expune în situl *A* codonul inițiator AUG care va permite pătrunderea în acest sit a ARN*t* inițiator *f*Met — ARNt^{fmet}. IF_2 acționează apoi ca *translocază* care catalizează translocația *f*met — ARNt^{fmet} și regiunea corespunzătoare codonului AUG din ARN*m* din situl *A* în situl *P*. Reacția necesită energie eliberată din hidroliza GTP. Translocarea eliberează situl *A* care va putea accepta alt AA — ARN*t* corespunzător noului codon din ARN*m*. Astfel, ARN*t* funcționează nu numai ca un cărăuș de aminoacizi la ribozomi dar și ca moleculă adaptoare care secvențiază aminoacizii în catena polipeptidică potrivit instrucțiunilor date de ARN*m*.

4.1.2. *ALUNGIREA CATENEI POLIPEPTIDICE*

De îndată ce a avut loc inițierea catenei polipeptidice prin alinierea codonului inițiator AUG cu anticodonul metionil — *i*ARNt^{met} și formarea unei particule ribozomale complete, activă în sinteza proteinică, situl *P* al ribozomului este ocupat de *i*ARNt^{met} iar situl *A* este liber să primească al doilea aminoacil — ARN*t* corespunzător celui de-al doilea codon din ARN*m*. Particula ribozomală se deplasează pe monocatena ARN*m*, care își expune astfel succesiv codonii spre a fi recunoscuți de anticodonul diferiților ARN*t*. Legarea aminoacil-ARN*t* la situl *A* este catalizată de un *factor proteinic T* care folosește de asemenea energia eliberată de GTP.

La nivelul sitului *P*, grupul α—COOH părăsește legătura cu ARN*t* și formează o legătură peptidică cu grupul α—NH_2 al aminoacidului legat de ARN*t* intrat în situl *A*. Trecerea aminoacidului de la legătura cu ARN*t* la legătura peptidică se realizează prin intervenția enzimei *peptidiltransferază,* legată

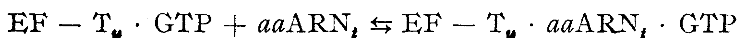
de subunitatea mare a ribozomului. Formarea legăturii peptidice este catalizată de enzima *peptidilpolimerază* sau *aminoacid-polimerază* localizată pe subunitatea mare a ribozomului. Se formează un dipeptid, iar ARN*t* din situl *P* rămîne fără aminoacid și părăsește ribozomul, al doilea ARN*t* purtînd doi aminoacizi uniți printr-o legătură peptidică (un rest dipeptid) trece din situl *A* și intră în situl *P*. Această trecere din situl *A* în situl *P*, condiționată de formarea legăturii peptidice a ARN*t* se numește *translocație* (fig. 42). Ea este mediată de un factor proteinic numit *G* a cărui acțiune este dependentă de energia eliberată prin hidroliza GTP, ca și de o notabilă modificare conformațională a structurii ribozomului. Totodată ribozomul se deplasează pe ARN*m* pe o distanță echivalentă cu un codon. Noul codon va ajunge la nivelul sitului A, unde va pătrunde un nou aminoacil — ARN*t* cu un anticodon corespunzător. Pe măsură ce ribozomul se mișcă în direcția $5' \rightarrow 3'$, de-a lungul catenei ARN*m* are loc alungirea catenei polipeptidice și totodată descifrarea mesajului genetic din ARN*m*. Cercetările lui Fritz Lipmann au arătat că în procesul de asamblare a aminoacizilor intervin trei tipuri diferite de proteine care s-au numit *factori de elongație* și au fost desemnați $EF—T_u$, $EF—T_s$ și $EF—G$. Aceștia sînt componente structurale ale ribozomului și se atașează la particula ribozomală matură doar în faza de funcționare a acesteia în asamblarea aminoacizilor în catena polipeptidică.

La *E. coli*, $EF—T_u$ și $ET—T_s$ reprezintă 5% din proteina solubilă și participă în transferul aminoacil-ARN*t* la situl aminoacil al ribozomului. Factorul $EF—T_s$ facilitează formarea unui complex dintre factorul $EF—T_u$, aminoacil-ARN*t* și GTP. Ribozomul care poartă un peptidil-ARN*t*, în situl său *P* acceptă acest complex la situl său aminoacil. Cînd are loc formarea legăturii peptidice $EF—T_u$ este eliberat iar GTP este hidrolizat spre a da GDP și fosfat cu eliberare de energie. Factorul $EF—G$ participă în translocarea (mișcarea de translație) a ARN*m* pe ribozom spre a fi expus următorul codon în situl A. Translocarea implică consum de energie derivată din hidroliza unei molecule de GTP în GDP și *P*. Elongarea însăși a catenei polipeptidice nu necesită energia eliberată prin hidroliza GTP, deoarece energia liberă înmagazinată în legătura aminoacil-ARN*t* este suficient de mare spre a conduce la formarea punții peptidice.

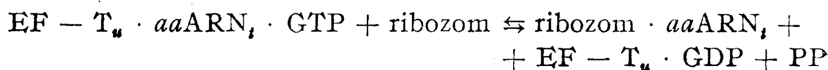
GTP acționează așadar ca un factor alosteric a cărui combinare cu proteina $EF—T_u$ determină o modificare conforma-

țională a factorului EF—T_u care permite amino-acil-ARN*t* să se lege la situl ribozomal corespunzător. După elongarea catenei polipeptidice născînde, GTP este hidrolizat făcînd ca EF—T_u să revină la conformația inițială și să se desprindă de pe ribozom.

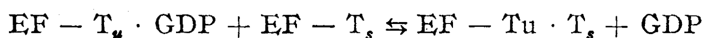
Iată reacțiile în care factorii de elongație sînt implicați în alungirea catenei polipeptidice (Blumenthal și Carmichael, 1979):



$$EF - T_u \cdot GTP + aaARN_t \leftrightarrows EF - T_u \cdot aaARN_t \cdot GTP$$



$$EF - T_u \cdot aaARN_t \cdot GTP + ribozom \leftrightarrows ribozom \cdot aaARN_t + EF - T_u \cdot GDP + PP$$



$$EF - T_u \cdot GDP + EF - T_s \leftrightarrows EF - Tu \cdot T_s + GDP$$



$$EF - T_u \cdot T_s + GTP \leftrightarrows EF - T_u \cdot GTP + EF - T_s.$$

Viteza de polimerizare a aminoacizilor este de 15 aminoacizi pe secundă. După ce un ribozom a tradus aproximativ 25 codoni capătul 5′ al ARN*m* devine liber spre a forma un al doilea complex de inițiere și un al doilea ribozom începe mișcarea de-a lungul catenei ARN*m*, determinînd sinteza unei a doua catene polipeptidice, apoi un al treilea, al patrulea ribozom ș.a.m.d

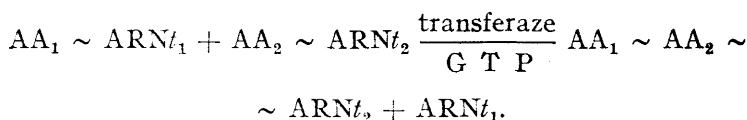
Prin atașarea mai multor ribozomi la catena ARN*m* rezultă o structură numită *poliribozom*. Structura poliribozomală condiționează sinteza simultană a numeroase catene polipeptidice care au dimensiuni diferite la un moment dat, în funcție de distanța pe care fiecare ribozom a parcurs-o de la capătul 5′ spre capătul 3′ al catenei ARN*m*.

La procariote transcrierea (sinteza ARN*m*) și traducerea mesajului (sinteza proteinică) au loc simultan, și înainte ca să se termine sinteza ARN*m*, capătul său 5′ devine asociat cu ribozomul spre a forma un *complex de inițiere* (fig. 42b).

La eucariote transcrierea are loc în nucleu iar traducerea în citoplasmă unde se află ribozomii. Există o specificitate a activității ribozomilor în sinteza proteinică care ar reprezenta o modalitate de reglare a activității genelor la nivelul traducerii. Astfel, în sistemele de sinteză proteinică *in vitro* (acelulară) se constată că ribozomii izolați din celulele interfazice sînt mai activi decît cei izolați din celule aflate în diviziune. În celulele hepatice, ribozomii atașați la reticulul endoplasmic

servesc pentru sinteza proteinelor serice pe cînd cei liberi servesc la sinteza proteinelor hepatice specifice neserice.

Alungirea catenei polipeptidice poate fi schematizată astfel:



$$AA_1 \sim ARNt_1 + AA_2 \sim ARNt_2 \xrightarrow[GTP]{\text{transferaze}} AA_1 \sim AA_2 \sim$$

$$\sim ARNt_2 + ARNt_1.$$

Atașarea ribozomilor la monocatena ARN*m* facilitează păstrarea structurii liniare, monocatenare a ARN*m*, favorabilă unei citiri corecte a mesajului, unei decodificări corespunzătoare. În cazul în care pe parcursul catenei ARN*m* apar regiuni dublu-catenare ribozomii le desfac spre a permite o corectă selecționare a AA~ARN*t*.

Lungimea moleculelor ARN*m* este heterogenă, depinzînd de mărimea mesajului genetic purtat. La *E. coli* mărimea medie a ARN*m* este de 900—1500 nucleotide purtînd un mesaj care corespunde la catene polipeptidice de 300—500 aminoacizi.

În sinteza histidinei intervin 10 enzime. Acestea sînt sintetizate sub direcția unui mesaj purtat de o singură moleculă de ARN*m*.

4.1.3. *TERMINAREA CATENEI POLIPEPTIDICE*

Cînd ribozomul în deplasarea sa pe ARN*m* întîlnește în situl *A* un *codon terminator* la care nu mai răspunde nici un tip de aminoacil-ARN*t* are loc încetarea sintezei catenei polipeptidice căci un asemenea codon nu este recunoscut de nici un anticodon ARN*t*, prezența sa în situl *A* al ribozomului blocînd adăugarea oricărui alt aminoacid la catena polipeptidică. Codonii UAA, UGA și UAG sînt *codoni terminatori*. Uneori există nu un singur codon terminator ci doi codoni terminatori succesivi spre a asigura că sinteza catenei polipeptidice se termină în punctul corespunzător. Terminarea catenei polipeptidice este un proces activ și nu se datorește simplului fapt că un codon nu poate fi citit. Codonii terminatori (*stop* sau *nonsens*) spre deosebire de codonii sens care sînt citiți (recunoscuți) de diferitele tipuri de ARN*t* sînt recunoscuți de către factori proteinici numiți și *factori de eliberare*. Semnalele de terminare reprezentate de cei trei codoni terminatori (nonsens) sînt recu-

noscute de trei factori proteinici (enzimatici) de terminare ($TF—R_1$, $TF—R_2$ *și* $TF—R_3$). $TF—R_1$ recunoaște codonii UAA și UAG, $TF—R_2$ recunoaște codonii UAA și UGA. Codonul UAA (ocru) se pare că este cel mai eficient codon terminator, pe cînd UAG (*amber*) și UGA (opal = *azur*) ar reprezenta semnale accesorii care să asigure că terminarea nu eșuează. UAA și UAG asigură terminarea eficientă a traducerii la bacterii în proporție de 100%. UGA este rareori mai eficient de 98%, iar la codonii terminatori „leaky" — slabi, adică un terminator aparent greșit citit ca un codon ce specifică un aminoacid, eficiența terminării este scăzută dar semnificativă. Aceasta duce la alungirea catenei polipeptidice dincolo de codonul de terminare. Codonul terminator interacționează, cu factori proteinici care au fost notați cu *R*, creîndu-se un *complex R-codon terminator-ribozom* care blochează alungirea în continuare a catenei polipeptidice. Terminarea implică formarea în situl *A* a unui complex ce include $TF—R_1$ sau $TF—R_2$, codonul terminator UAA și ribozomul. $TF—R_3$ acționează atunci enzimatic la nivelul sitului *P* spre a separa grupul carboxil al aminoacidului *C* terminal de legătura sa cu ARN*t* printr-o hidroliză, eliberînd peptidul. Blocarea sitului *A* face ca polipeptida completă să rămînă esterificată la ARN*t* final care ocupă situl *P*. Factorul proteinic $TF—R_3$ va rupe această legătură, făcînd ca să fie eliberați din ribozom atît catena polipeptidică cît și ARN*t*. Totodată are loc disocierea ribozomului în subunitățile sale mare și mică, proces mediat de factorul IF_3 implicat după cum s-a văzut și în medierea formării complexului de inițiere. În procesul de terminare a catenei polipeptidice au fost implicate și proteinele ribozomale L_7 și L_{12}.

Sinteza proteinică este însoțită de așa-numitul *ciclu ribozomal* (fig. 43). Mai întîi are loc asamblarea ribozomului din subunitățile sale. Pînă în anul 1967 s-a crezut că subunitățile 30 *S* și 50 *S* ale ribozomului sînt permanent cuplate spre a forma un ribozom matur 70 *S* dar, din acest an, s-a stabilit că subunitățile ribozomale se asociază doar atunci cînd sînt active în sinteza proteinică. De îndată ce a fost tradus mesajul genetic din ARN*m* și s-a terminat sinteza catenei polipeptidice, ribozomul se disociază de pe ARN*m*, subunitățile ribozomului se separă și ele își iau alți parteneri (30 S_1 + 50 S_1 30 S_2 + 50 S_2 într-un ciclu de sinteză și 30 S_1 + 50 S_2 respectiv 30 S_2 + 50 S_1 în următorul ciclu de sinteză.

Prin experiențe de marcaj cu izotopi grei și radioactivi, Meselson a arătat natura efemeră tranzientă a cuplării de sub-

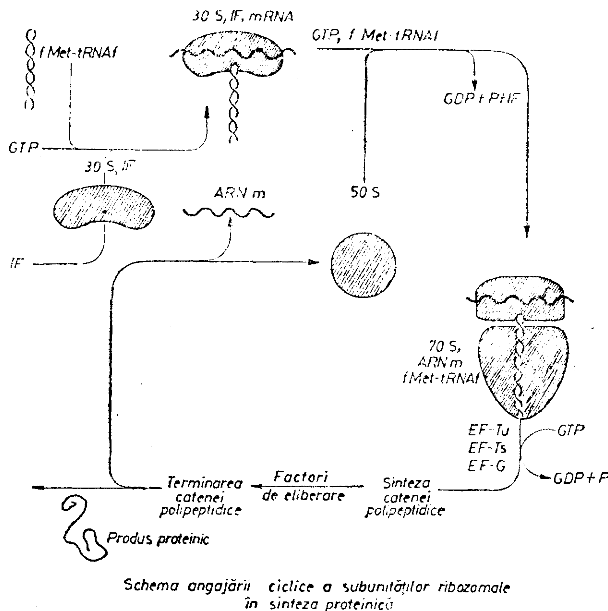


Fig. 43. **Schema aranjării ciclice a subunităților ribozomale în sinteza proteinică.**

unități ribozomale în constituirea de particule ribozomale mature, funcționale. În timpul inițierii are loc legarea factorilor de inițiere *IF—1, IF—2* și *IF—3* la subunitatea 30 *S*.

Inițierea mai necesită ARN*t* formilmetionil la bacterii sau ARN*t*-metionina la eucariote, ARN*m* asociat subunității 30 *S*, GTP. Aceste componente alcătuiesc așa-numitul complex de inițiere. Complexul de inițiere se combină cu o subunitate ribozomală 50 *S* spre a forma un ribozom funcțional 70 *S*. Procesul este însoțit de hidroliza unei molecule de GTP din care rezultă energie avînd loc și eliberarea factorilor *IF*. Se desfășoară apoi translocația ribozomului reprezentînd deplasarea ribozomului de-a lungul ARN*m* pe o distanță ce corespunde cu fiecare mișcare la trei nucleotide (codon). Translocația ribozomului este un proces activ care necesită energie pusă la dispoziție prin hidroliza GTP precum și intervenția unui *factor G* numit *factor de translocație*. Siturile de interacțiune cu G și GTP se află în subunitatea ribozomală mare. Pentru realizarea translocației ribozomale, ARN*t* deacilat (lipsit de aminoacid) trebuie

să fie expulzat din situl *P*, peptidil-ARN*t* trebuie să se deplaseze din situl *A* în situl *P*, iar ARN*m* trebuie să se deplaseze pe subunitatea ribozomală mică astfel încît să poată expune următorul codon în situl *A*. După parcurgerea întregii molecule de ARN*m*, ribozomul se disociază în subunităţile sale. La o nouă reconstituire de particule ribozomale, subunităţile ribozomale se pot schimba între ele. Reciclarea necesită un factor de iniţiere numit *factor de disociere ribozomală* ce menţine poliribozomii, inhibă disocierea subunităţilor ribozomale înainte de a fi disponibil mesagerul, condiţionează intrările cantitative ale subunităţilor mari în poliribozomi, permite acumularea de subunităţi ribozomale în loc de acumulare de particule ribozomale unice şi este cerut de legarea ARN*m* la ribozomi.

CONCLUZII

În procesul de biosinteză proteinică se realizează decodificarea informaţiei genetice.

Procesul de biosinteză proteinică este extrem de complex şi implică recunoaşteri pe bază de complementaritate dintre acizii nucleici, în care rol esenţial are relaţia codon-anticodon.

Întreg procesul de biosinteză proteinică se desfăşoară prin intervenţia unui număr mare de alte proteine cu caracter enzimatic sau care funcţionează în calitate de factori de recunoaştere (iniţiere, elongare, terminare). Este o reînnoită povară pentru celulă cînd îşi sintetizează o catenă polipeptidică, căci pentru aceasta ea pune în funcţiune un număr incomparabil mai mare de alte proteine.

— În celulele procariote cu ARN*m* de scurtă durată de viaţă reglarea expresiei genelor apare în principal la nivelul transcrierii (vezi reglajul genetic).

— La Eucariote cu ARN*m* de durată de viaţă mai lungă, expresia genică este controlată atît la nivelul transcrierii, cît şi a traducerii. Reglarea traducerii în acest caz are loc în parte în timpul iniţierii catenelor polipeptidice, ceea ce explică de ce factorii de iniţiere eucariotici sînt mai numeroşi şi mai complicaţi structural decît omologii lor procariotici (Ochoa S. şi de Haro, 1979). Pe cînd aparatul de iniţiere procariotic constă din 2 sau 3 factori de iniţiere, cel eucariotic implică cel puţin 7

sau 8 asemenea factori. Factorul procariotic *IF—2,* care mijlocește legarea metionil-ARN*t* inițiator, constă dintr-o singură catenă polipeptidică cu greutatea moleculară 80 000—90 000, iar factorul de recunoaștere a ARN*m* *IF—3* constă dintr-o catenă polipeptidică cu greutatea moleculară de 23 000 daltoni. Factorul de inițiere eucariotic e IF—2 este compus din 3 subunități cu greutate moleculară combinată de 150 000 daltoni, iar *IF—3* are nu mai puțin de 10 subunități care dau o greutate moleculară totală de 500 000 daltoni.

Controlul traducerii la eucariote implică intervenția proteinkinazelor care, atunci cînd sînt activate inhibă traducerea. Se cunosc două mecanisme majore ale controlului traducerii la eucariote. Primul controlează inițierea catenei polipeptidice prin blocarea funcționării factorului de inițiere e *IF—2,* blocare care este realizată prin fosforilarea uneia dintre cele trei subunități ale sale. Această fosforilare este catalizată de proteinkinaza.

Al doilea mecanism de blocare a traducerii implică degradarea ARN*m* pe calea activării unei *endonucleaze* prin intermediul unei oligonucleotide ce are o structură neobișnuită *ppp A 2′ p 5′ A 2′ p 5′ A.* Această nucleotidă este sintetizată din ATP sub acțiunea tot a unei *protein-kinaze.*

Anumite oligonucleotide mici, aflate în celulele eucariote, formate aparent în urma digestiei endonucleazice a ARN celular pot afecta traducerea la nivelul elongației catenei. Ele pot fi implicate în tranziția de la o stare dormantă sau liniștită la o stare activă ca în emergența din criptobioză a artropodului *Artemia salina* sau în fecundarea ovulului.

Blocarea funcției e *IF—2* și degradarea ARN*m* după cunoștințele actuale inhibă traducerea într-o manieră neselectivă. Cercetările viitoare vor aduce noi date asupra unor căi selective de modulare a traducerii diferiților mesageri, ca și asupra rolului fosforilării proteinelor ribozomale și factorilor ce intervin în biosinteza proteinică, alții decît e *IF—2.*

Recent s-a descoperit o proteină stimulatoare a e IF—2 desemnată *ESP,* care determină ca e IF—2 să formeze un complex ternar cu GTP și ARN*t* *metionil inițiator.* Acest complex ternar se leagă la o subunitate 40 *S* a ribozomului eucariotic dînd naștere la un complex de inițiere în care intră și ARN*m.* În urma fosforilării subunității mici a e *IF—2* este blocată interacțiunea e *IF—2* cu ESP și astfel nu se poate forma complexul ternar de inițiere, fiind inhibată în consecință traducerea (Ochoa și Haro, 1979).

Capitolul V

CARACTERISTICILE ORGANIZĂRII ȘI FUNCȚIONĂRII FACTORILOR EREDITARI (GENELOR)

Cel care s-a ocupat pentru prima dată de problema organizării și funcționării factorilor ereditari, stabilind caracteristicile lor a fost Gregor Mendel, părintele Geneticii — știința eredității.

La organismele procariote funcționarea și transmiterea factorilor ereditari prezintă un tablou mai puțin complex comparativ cu organismele eucariote. Ciclul de viață al organismelor procariote este simplu. Reproducerea lor se realizează prin diviziune celulară, neexistînd diferențieri celulare majore. Existența unui singur cromozom-genofor — substratul fizic unic al tuturor genelor pe care le prezintă o celulă procariotă, face ca de regulă fiecare genă să fie prezentă într-un singur exemplar, într-o singură copie, în genomul procariot. Ea se va exprima deci liber în fenotip, în funcție de necesitățile de moment ale celulei (vezi reglarea activității genice).

La eucariote lucrurile sînt ceva mai complicate. Existența mai multor genofori — cromozomii — creează premisa prezenței în genotipul unei celule, respectiv individ, a mai multor copii ale aceleiași gene, adică a unor stări alternative ale acesteia. Comportamentul factorilor ereditari depinde nu numai de aspecte legate de mecanismul reglării activității genelor, dar și de complexitatea organizării genomului eucariot și de prezența unei gene date, în aceeași celulă, în cel puțin două stări alternative.

1. CICLUL DE VIAȚĂ LA ORGANISMELE SUPERIOARE

Organismele eucariote se pot reproduce fie pe cale asexuată (vegetativ la plante, somatic la animale) fie pe cale sexuată propriu-zisă, cu diferențiere de sexe opuse, mascul și femel. Reproducerea asexuată se realizează cel mai adesea pe calea diviziunii celulare la eucariotele inferioare, unicelulare (alga *Chlorella* bunăoară) sau prin diferențiere de organe de reproducere vegetativă, la plante.

Eucariotele, mai ales cele superioare, se caracterizează însă prin reproducerea sexuată tipică, în care se diferențiază anizogameți — gameți diferiți morfofiziologic — ovulul la animale și oosfera la plante, pentru sexul femel, spermatozoidul la animale și nucleul spermatic (derivat din diviziunea nucleului generativ rezultat în urma diviziunii nucleului haploid al microsporului — grăunciorul de polen) pentru sexul mascul.

În ciclul de viață la organismele cu reproducere sexuată alternează o fază sexuată (gametofitică) și a fază vegetativa (sporofitică).

La animalele superioare precum Drosophila și omul, faza sexuată este reprezentată doar de celulele din linia germinală care produc gameții. Ele sînt *diploide* (2n), se diferențiază din celulele liniei somatice prin diviziuni mitotice succesive încă din primele faze ale embriogenezei și doar ele vor suferi meioza spre a deveni gameți.

Plantele nu posedă o linie germinală. La plantele care se reproduc pe cale sexuată, în floare, reprezentînd o parte a sporofitului, unele celule vor fi induse spre a se diferenția în megasporofit la sexul femel și microsporofit la cel mascul și aceste celule vor suferi meioza. În urma meiozei rezultă *megaspori* (ovulul) și *microspori* (polenul) care se divid mitotic spre a produce ceea ce se cheamă gametofit. La plantele inferioare (talofite) gametofitul este foarte dezvoltat pe cînd sporofitul este redus. La plantele cu flori în special angiosperme, gametofitul este foarte redus pe cînd sporofitul (reprezentînd planta întreagă) este foarte dezvoltat. În procesul de fecundație din unirea ovulului cu spermatozoidul respectiv a oosferei cu nucleul spermatic, se reface garnitura diploidă de cromozomi, rezultînd oul sau zigotul diploid care, prin diviziuni succesive va genera un nou organism. Meioza și fecundarea sînt fenomene compensatorii.

2. CARACTERISTICILE GENETICE ALE MEIOZEI

Meioza este diviziunea celulară care duce la formarea celulelor reproducătoare. În cadrul ei, după o singură rundă de replicare a ADN se desfăşoară două diviziuni nucleare succesive. În urma replicării ADN, o celulă 2n cu o cantitate 2C de ADN va dobîndi o cantitate dublă de ADN de nivel tetraploid — 4C.

După prima diviziune meiotică rezultă două celule care au o cantitate diploidă de ADN (2C) şi cu număr de cromozomi redus la jumătate (n). Aceste celule suferă o a doua diviziune meiotică şi vor da patru celule cu cantitate haploidă de ADN (1C), dar cu acelaşi număr de cromozomi redus la jumătate (n).

În prima diviziune meiotică, anume în *profaza* acesteia evenimentul cel mai important este sinapsa cromozomilor omologi care condiţionează reducerea aparentă a numărului de cromozomi. Cromozomii bicromatidici avînd o cantitate 4C de ADN (duplicaţi) se asociază în perechi, pe bază de omologie, formînd bivalenţii. În metafaza primei diviziuni meiotice fiecare bivalent se aşază în placa metafazică, astfel ca unul dintre cromozomii omologi să fie deasupra, iar celălalt dedesubtul planului ecuatorial al acesteia. Această aşezare a cromozomilor omologi ce alcătuiesc bivalenţii condiţionează o disjuncţie (segregare) ordonată spre poli a cromozomilor omologi, din fiecare bivalent unul dintre omologi migrînd spre un pol (deci într-un gamet), celălalt în mod obligatoriu, legic determinat, migrînd spre polul opus (într-un alt gamet). Din prima diviziune meiotică rezultă doi nuclei fii, fiecare avînd un număr de cromozomi reprezentînd jumătate din garnitura diploidă a celulei somatice. De asemenea, aceşti nuclei au o cantitate de ADN redusă la jumătate faţă de cantitatea de ADN a nucleului interfazic de dinainte de meioză.

Prima diviziune meiotică este reducţională. Nucleii haploizi rezultaţi din prima diviziune meiotică suferă, fără a mai avea loc o sinteză interfazică de ADN, o a doua diviziune meiotică care se desfăşoară după mecanismul mitotic tipic, cu clivarea longitudinală a centromerului şi migrarea spre poli nu de cromozomi bicromatidici ca în prima diviziune meiotică, ci de cromozomi monocromatidici. A două diviziune meiotică desăvîrşeşte astfel şi reducerea cantităţii de ADN, care de la 2 C ajunge la 1 C, cantitate specifică gameţilor haploizi. Iau naştere

patru nuclei haploizi ca rezultat a două diviziuni meiotice succesive.

Celulele organismelor diploide care se reproduc pe cale sexuată, prezintă două seturi de cromozomi, unul provenind de la mamă, adus la nivelul zigotului de către ovul, altul provenind de la tată, adus la nivelul zigotului de către spermatozoid. Fiecare set de cromozomi este alcătuit din cromozomi neomologi, neasemănători. În cadrul complementului diploid însă, doi cîte doi cromozomi sînt asemănători adică omologi, unul fiind de proveniență maternă iar altul de proveniență paternă. Asemenea cromozomi omologi poartă aceleași gene în loci corespunzători și prezintă aceeași morfologie. Astfel, starea diploidă a organismelor eucariote implică existența locilor omologi și a genelor alele; cel puțin cîte două gene din genotipul organismului eucariot controlează același caracter. În timpul meiozei acești cromozomi omologi se împerechează, formînd bivalenții. În împerecherea omologilor un rol esențial revine complexului sinaptinemal.

3. LOCALIZAREA GENELOR PE CROMOZOMI

În anul 1903 Sutton a stabilit relația dintre comportamentul cromozomilor în meioză (segregare) pe de o parte și disjuncția (asortarea) independentă a genelor pe de altă parte, fapt care a stat la baza elaborării teoriei cromozomale a eredității de către Morgan și școala sa, în 1919.

S-a putut constata că o genă nu poate să corespundă la un cromozom întreg de vreme ce oricare organism, fie el procariot (unde există un singur cromozom) fie eucariot posedă mai multe gene decît cromozomi. Singura posibilitate rămînea ca pe un singur cromozom să se afle mai multe gene care sînt lincate sau înlănțuite. S-a stabilit că fiecare genă ocupă o anumită poziție (*locus*) strict determinată pe cromozom și că pe cromozomii omologi alelele unei gene ocupă poziții corespunzătoare. Mai exact alelele unei gene ocupă același locus pe cromozomii omologi. Ulterior poziția ocupată de o genă pe cromozom a fost asimilată cu gena ca atare, încît atunci cînd se vorbește de un locus genic se înțelege gena propriu-zisă. Pluralul de la locus este loci.

Genele plasate pe un același cromozom manifestă tendința de a se transmite înlănțuit la descendenți, în virtutea faptului

că ele sînt fizic înlănţuite, iar cromozomul este trecut ca entitate integră, discretă, din celula iniţială în celulele fiice.

Pe de altă parte, genele care sînt localizate pe diferiţi cromozomi (pe cromozomi neomologi) nefiind înlănţuite segregă independent unele de altele căci şi perechile de cromozomi în anafaza primei diviziuni meiotice (AI) segregă independent unele de altele. Dacă dintr-o pereche dată de cromozomi, cromozomul de origine maternă migrează spre un pol, în mod legic determinat cromozomul de origine paternă migrează spre polul opus. Dar, considerînd o altă pereche de cromozomi, nu este obligatoriu să migreze spre polul spre care a migrat din prima pereche cromozomul matern tot, cromozomul de origine maternă. Astfel, spre poli, în nuclei fii, rezultaţi din prima diviziune meiotică, vor migra cromozomi de origine diferită, maternă şi paternă, migrarea fiind un eveniment determinat stohastic, probabilistic. În asemenea nuclei vor apare constelaţii genetice de cromozomi, respectiv de gene diferite ca origine (materne şi paterne), ca provenienţă, de cele care au fost la genitori.

Aceste concluzii au fost desprinse însă după ce s-a studiat fenomenul ereditar la nivel celular.

Dar, înainte de a fi cunoscute mecanismele intime ale meiozei şi implicarea cromozomilor în ereditate, Gregor Mendel, studiind hibridarea la mazăre, a ajuns la concluzii care îşi păstrează în totalitate valabilitatea şi astăzi, astfel că el, călugărul augustin Gregor Mendel, născut la Heinzendorf (Cehoslovacia) în 1822, este considerat fondatorul ştiinţei eredităţii.

4. DESCIFRAREA NATURII GENOMULUI (GENOTIPULUI) PRIN STUDIUL FENOTIPULUI (ANALIZA GENETICĂ) (GENETICA FACTORIALĂ SAU FORMALĂ)

Cercetările lui Mendel se deosebesc radical de cele ale predecesorilor săi (cei mai reprezentativi fiind Knight, Goss, Ch. Naudin) prin trei elemente de noutate: modul de a privi experienţa şi de a alege materialul potrivit, introducerea discontinuităţii şi folosirea marilor populaţii, ceea ce permite exprimarea rezultatelor prin numere şi prelucrarea lor matematică, ca şi folosirea unor simboluri simple pentru desemnarea factorilor ereditari de natură corpusculară, prin care devine posi-

bil un neîncetat dialog dintre experiment și teorie, dintre experimentator și experiența sa.

Noua metodologie, prelucrarea statistică și reprezentarea simbolică impun eredității o logică internă. Cu Mendel, interpretarea fenomenelor biologice dobîndește dintr-o dată rigoare matematică. Gîndirea sa a fost o gîndire revoluționară. El a ajuns la concluzia că trăsăturile (caracterele) ereditare ale unui individ sînt distincte, fiecare transmițîndu-se ca unități separate de la părinți la descendenți nu direct, așa cum credeau predecesorii săi, ci indirect, prin intermediul unor factori ereditari. Astfel, deși un individ poate să posede mii de trăsături distincte care alcătuiesc individualitatea sa, fiecare din aceste trăsături sînt controlate de către unități ereditare sau *factori ereditari* care au un caracter discret (în sens de distinct din punct de vedere fizic). Mendel a stabilit că ereditatea urmează legi simple și exacte pe baza cărora poate fi prezis comportamentul oricărui factor ereditar care dirijează un anumit caracter. Moștenirea caracterelor se face după reguli foarte exacte, matematice.

Prin experiență dar și intuiție genială, Mendel a statuat că diferitele caractere ale unui organism dat sînt determinate de factori ereditari de natură materială, localizați în nucleul celular, fiind în doză dublă în celulele somatice și în doză simplă în celulele reproducătoare (gameți). Prezența factorului ereditar în doză dublă a fost probabil sugerată lui Mendel de participarea a doi indivizi diferiți la nașterea unui singur individ la organismele ce se reproduc pe cale sexuată. Este acum ușor pentru noi să apreciem că această situație corespunde cu aceea a numărului de cromozomi sau a cantității de ADN, dar Mendel nu știa acest lucru, deoarece la vremea cînd a elaborat tezele sale nu se descoperise nici cromozomii, nici ADN, nici meioza.

Mendel a mai stabilit că factorii ereditari în celulele somatice fiind în doză dublă se află sub formă de pereche sau cum a definit el cu termenul grecesc sub formă de *alele*.

Acum știm că factorul ereditar mendelian este o genă și că gena poate exista sub forma a două stări alternative, numite *alele* din care una este *dominantă (A)* și alta *recesivă (a)*. Aceste două stări alternative ale aceleiași gene sînt rezultatul posibil al mutației bidirecționale: $A \rightleftarrows a$. Existența genelor poate fi sesizată numai cînd ele determină un caracter ce poate să apară sub două stări alternative. Abia atunci vom putea ști că există o genă care, într-o anumită stare determină o anumită

formă a caracterului considerat (bob neted în cazul formei bobului de mazăre) și într-o altă stare determină cealaltă formă a caracterului (bob zbîrcit).

Cele două alele ocupă același locus pe o pereche dată de cromozomi omologi. Astfel, dacă alela A se află pe cromozomul de origine maternă, într-un anumit sit sau locus, pe cromozomul omolog de origine paternă, în același locus se va afla fie gena „A“, fie alela sa „a“. Situarea alelelor poate fi și reciprocă, „A“ pe cromozomul de origine paternă și „a“ pe cel de origine maternă.

Într-un alt locus pe aceeași pereche de cromozomi omologi se află altă genă „B“ prezentă sub forma alelelor „B“ și „b“. Genele A și B, fiind plasate pe același cromozom se transmit de regulă împreună la descendenți.

Pe celelalte perechi de cromozomi se află alte gene (X, Y, Z etc.) și transmiterea lor la descendenți nu este legată direct de transmiterea genelor A și B.

Gena A prezentă cu alelele sale *A* și *a* în același locus pe cei doi cromozomi omologi poate determina variația expresiei fenotipice de regulă a unui singur caracter.

Prezența unei gene sub forma a două stări alternative (alele) poate fi comparată cu un întrerupător electric care prezintă două stări posibile, alternative:

— închis și în acest caz lumina este stinsă;

— deschis și în acest caz lumina este aprinsă.

Să exemplificăm din experiențele lui Mendel. El a efectuat hibridări de mazăre. Mazărea prezintă mari avantaje pentru studiul comportării factorilor ereditari (genelor) deoarece este o plantă autogamă (fiecare plantă produce atît polen cît și ovule) și prin autofecundare se păstrează nealterată puritatea genetică. Din această cauză mazărea prezintă multe soiuri pure care se deosebesc tranșant între ele prin caractere contrastante (bob neted — bob zbîrcit; bob galben — bob verde; flori roșii — flori albe; port înalt — port pitic etc.) care se mai numesc și caractere *alelomorfe* și care pot fi observate cu ușurință. Puritatea genetică a unui soi este dovedită de faptul că prin autofecundare se păstrează nealterate caracterele sale, adică se transmit fidel, neschimbate, de-a lungul generațiilor, dînd o descendență uniformă și asemănătoare formei inițiale. Pe de altă parte, un soi impur genetic va da naștere prin autofecundare la o descendență neuniformă, adică va segrega.

4.1. MONOHIBRIDAREA

Încrucişînd un soi pur de mazăre cu bob neted, cu un soi pur de mazăre cu bob zbîrcit Mendel a obţinut în prima generaţie (F_1) organisme hibride care prezentau fenotipic (exteriorizau) doar caracterul de bob neted. Experienţa de încrucişare în care se ia în consideraţie doar o pereche de caractere alelomorfe se numeşte experienţă de *monohibridare*. În al doilea an, a cultivat boabele hibride din F_1 lăsînd plantele să se autopolenizeze şi a obţinut cea de-a doua generaţie (F_2) de plante. În acest caz pe lîngă plante care făceau boabe netede au apărut şi plante care făceau boabe zbîrcite. Deoarece în prima generaţie, dintre cele două caractere contrastante neted-zbîrcit, s-a manifestat doar caracterul de bob neted, Mendel a numit acest caracter, *caracter dominant,* iar factorul ereditar care îl determină l-a considerat factor ereditar dominant şi l-a simbolizat cu litera mare „A“. În acelaşi timp caracterul de bob zbîrcit, neexprimat în F_1, a fost considerat caracter *recesiv,* iar factorul care îl determină a fost considerat factor ereditar recesiv şi a fost notat cu litera mică „a“. În virtutea celor spuse pînă acum, experienţa de hibridare a lui Mendel poate fi astfel schematizată (fig. 44).

Analiza fenotipică a celei de-a doua generaţii (F_2) a arătat că proporţia dintre plantele cu boabe netede şi plantele cu boabe zbîrcite era de 75% neted la 25% zbîrcit sau simplificat de 3:1. Acesta a fost numit raport de segregare şi s-a constatat a fi aproximativ acelaşi în toate experienţele de hibridare de acest tip. Analiza genotipică judecată după *fenotip* şi bazată pe intuiţie a sugerat că există trei categorii diferite genotipice de organisme *AA, Aa* şi *aa*. Apariţia doar a două categorii fenotipice de organisme în cadrul unei populaţii în care probabilistic apar patru posibilităţi de combinare a gameţilor i-a sugerat lui Mendel că în cazul structurii genotipice *Aa* se exteriorizează şi ca în cazul hibrizilor din F_1, doar caracterul dominant. Probabilitatea apariţiei caracterului dominant este de 3/4, iar a celui recesiv este de 1/4, de unde raportul fenotipic de segregare 3:1, cel genotipic fiind de 1 *AA* : 2 *Aa* : 1 *aa*. De

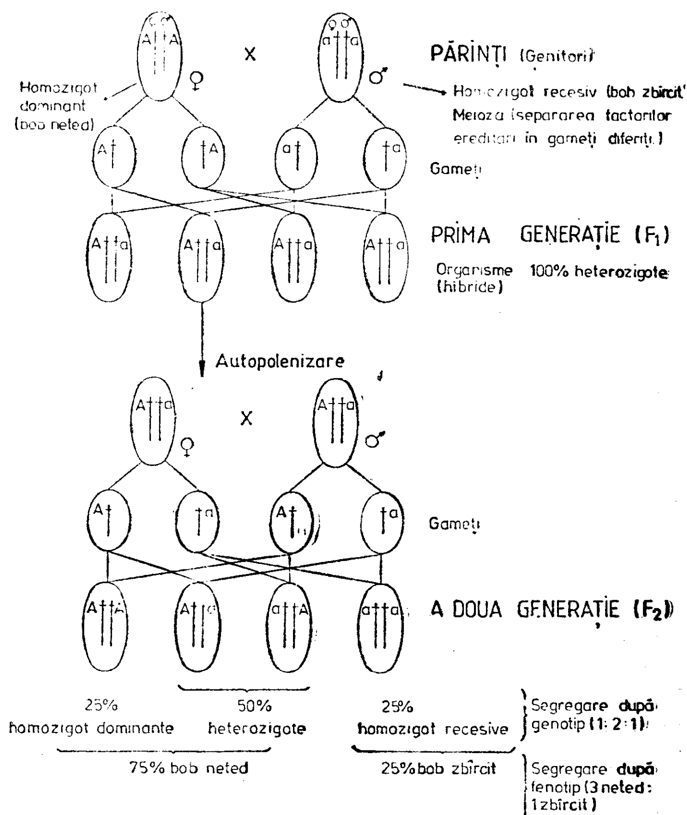


Fig. 44. **Monohibridarea (segregarea sau separarea factorilor ereditari).**

fapt, rezultatele experimentale obţinute de Mendel privind raportul fenotipic de segregare în cîteva experienţe sînt redate în tabelul 3.

Să considerăm cîteva aspecte legate de comportamentul factorilor ereditari. Factorul ereditar A este dominant. El condiţionează un caracter dominant, caracter care se manifestă în toate generaţiile, indiferent dacă intră sau nu alături de factorul ereditar *recesiv* în structura genetică (în genotipul) celulei, respectiv organismul considerat. El se exprimă în fenotip atît cînd se află în doză dublă *(AA)* cît şi atunci cînd se află

Tabel nr. 3

Raportul fenotipic de segregare în experienţele lui Mendel

Genitori (Părinţi)	F_1	F_2		Raport de segregare
Plante de bob neted x	bob neted	5474	plante cu boabe netede	2,96 : 1
Plante cu bob zbîrcit		1850	plante cu boabe zbîrcite	
Plante cu bob galben x	bob galben	6022	galbene	3,01 : 1
plante cu bob verde		2001	verzi	
Plante cu flori roşii x	flori roşii	705	roşii	3,15 : 1
Plante cu flori albe		224	albe	
plante cu păstăi verzi x	păstăi verzi	428	verzi	2,82 : 1
plante cu păstăi galbene		152	galbene	

în doză simplă *(Aa)*. Structura genetică *AA* este *homozigotă dominantă* pe cînd structura genetică *Aa* este *heterozigotă*.

Factorul ereditar *a* este recesiv. El condiţionează un caracter recesiv şi nu se poate exprima atunci cînd intră în structura genotipului alături de factorul ereditar dominant *(A)* la formele heterozigote *(Aa)*. Se spune că la organismele heterozigote dominanţa poate să mascheze genotipul. La organismele homozigote recesive *(aa)* fenotipul reflectă genotipul.

Factorul ereditar recesiv nu se manifestă decît atunci cînd se află în doză dublă, adică este plasat pe ambii cromozomi omologi, stare care se numeşte *homozigotă recesivă (aa)*.

O singură situaţie se cunoaşte în care în mod normal factorul ereditar recesiv se exprimă atunci cînd se află în doză simplă. Este cazul factorilor ereditari plasaţi pe cromozomii de sex la masculul de drosofilă sau mamifere. Formula cromozomală a sexului mascul în aceste cazuri este XY. Cei doi cromozomi de sex nu alcătuiesc o pereche, nefiind omologi. Dealtfel ei nici nu se împerechează intim pe toată lungimea lor în meioză. Cromozomul Y poartă foarte puţine gene printre care şi cele care intervin în masculinizare. Cromozomul X este un cromozom activ genetic. El poartă multe gene. Dacă o genă de pe cromozomul X se află în stare recesivă *(a)*, ea se exprimă fenotipic chiar fiind în doză simplă, căci pe cromozomul Y, nefiind omolog cu X, nu se poate afla niciodată alela sa dominantă *(A)*. Această stare, în care gena recesivă „a" se exprimă fenotipic, chiar cînd se află într-un singur exemplar se numeşte

stare de hemizigoție. Hemizigoția poate apare și la organismele aneuploide monosomice la care lipsește unul din cromozomi unei perechi de cromozomi.

Un alt aspect legat de factorii ereditari mendelieni se referă la *segregare*. În procesul hibridării, factorul ereditar dominant nu se amestecă cu factorul ereditar recesiv. Fiind de natură corpusculară, acești factori numai coexistă în genotipul hibrid, se alătură, fără însă a se contopi. Factorul ereditar dominant nu determină nici o alterare a factorului ereditar recesiv, ci numai nu-i permite exprimarea sa fenotipică (îl „domină"). Acest lucru este dovedit de reapariția factorului ereditar recesiv în generația F_2. Raporturile dintre factorii ereditari, dominant și recesiv sînt mai degrabă raporturi funcționale, cel recesiv neputînd funcționa în prezența celui dominant, sau produsul său de sinteză este acoperit de produsul specificat de factorul dominant.

Reapariția factorului recesiv în F_2 a sugerat lui Mendel fenomenul de segregare. Segregarea factorilor ereditari se suprapune segregării cromozomilor omologi din bivalenți în timpul meiozei. Fiecare din cei doi cromozomi omologi conține fie factorul ereditar „A", fie factorul ereditar „a" așa încît prin separarea lor spre poli opuși, acești factori ereditari vor fi separați și ei în nuclei diferiți respectiv în gameți diferiți atît la părintele de sex femel cît și la părintele de sex mascul.

Cînd într-o celulă se află două alele *(Aa)* acestea vor fi distribuite egal în gameți. Din cei patru produși ai meiozei (gameți) doi vor primi alela „A" și alți doi alela „a". Raportul de segregare alelică este *2A:2a* sau simplificat 1:1. Acest fenomen de segregare, disjuncție sau dezbinare a factorilor ereditari se numește *principiul segregării* sau *prima lege a lui Mendel*. Ea statuează că dacă organismele pot fi *pure* din punct de vedere genetic (homozigote dominante *AA* sau homozigote recesive *aa*) sau impure din punct de vedere genetic (heterozigote *Aa*), *gameții sînt legic puri* din punct de vedere genetic prin faptul că, derivînd în urma divizunii meiotice, cînd are loc reducerea numărului de cromozomi respectiv separarea factorilor ereditari, ei conțin fie factorul ereditar *A*, fie factorul ereditar *a*, niciodată, în condiții normale, ambii factori ereditari. Principiul segregării (separării factorilor ereditari)

$\left\{ Aa \begin{matrix} \nearrow \\ \searrow \end{matrix}, \; aa \begin{matrix} \nearrow a \\ \searrow a \end{matrix}, \; AA \begin{matrix} \nearrow A \\ \searrow A \end{matrix} \right\}$ se aplică în cazul factorilor ereditari plasați în același locus pe cromozomi omologi.

Considerînd fenomenul segregării, se constată că dacă în F_1 organismele rezultate din încrucişarea a doi genitori puri genetic (soiuri pure sau linii pure) sînt 100% heterozigote, datorită fenomenului de segregare, procentul organismelor heterozigote se reduce, cu fiecare generaţie la jumătate (fig. 45) astfel că teoretic, după circa 8 generaţii, în populaţia respectivă predomină organismele homozigote. Prin autopolenizarea organismelor homozigote rezultă doar organisme homozigote conform schemei din fig. 45.

Prin autofecundarea organismelor heterozigote are loc segregarea caracterelor. Aceasta este o cale de a deosebi organismele homozigote de cele heterozigote.

Reducerea heterozigoţiei şi creşterea homozigoţiei are mare importanţă în practica ameliorării. De exemplu, fenomenul de *heterozis* (vigoare hibridă) are la bază, ca mecanism genetic, constituţia 100% heterozigotă, a organismelor hibride. Înseamnă că acest fenomen se manifestă cel mai intens în prima generaţie. În celelalte generaţii prin segregare se reduce gradul de heterozigoţie şi implicit valoarea heterozisului. Totodată segregarea are importanţă practică în obţinerea de forme homo-

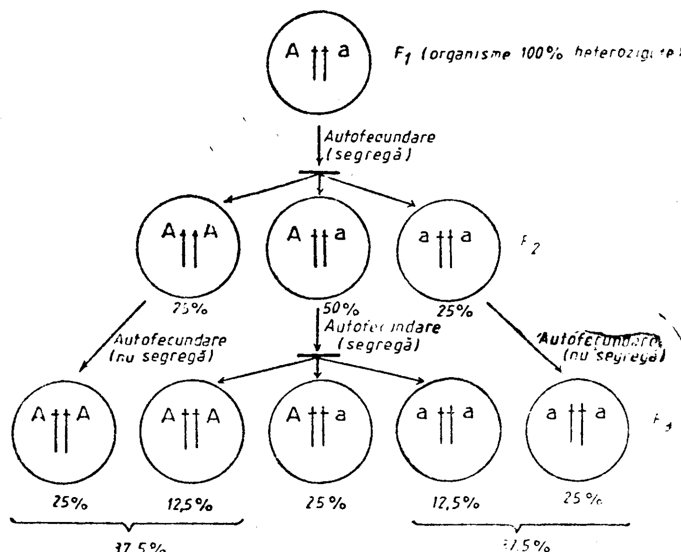


Fig. 45. Schema reducerii heterozigoţiei şi creşterii homozigoţiei cu fiecare generaţie de autofecundare (autopolenizare).

zigote — *linii pure (linii consangvinizate)* din a căror încrucișare se obțin hibrizi simpli care, la rîndul lor, prin încrucișare dau hibrizi dubli. Aceste aspecte genetice stau la baza obținerii liniilor consangvinizate, a hibrizilor simpli și dubli de porumb, floarea soarelui etc.

La animale consangvinizarea se realizează prin încrucișări de tip incest, mamă-fiu, tată-fiică, soră-frate etc. încît nu se obține o puritate absolută a liniilor consangvinizate. De asemenea segregarea are mare importanță în sfatul genetic. O maladie ereditară umană, determinată de o genă recesivă care s-a manifestat la bunici, sare peste o generație (părinți) și se manifestă din nou la copii. În funcție de natură dominantă sau recesivă a genei și de fenomenul de segregare se poate stabili riscul de apariție a bolii.

Cazul acesta în care un element (alelă) al perechii de factori ereditari este complet dominant iar celălalt element este complet recesiv se numește *dominanță completă*. În cadrul său, în general nu se poate spune, judecînd după fenotip, dacă un individ este homozigot sau heterozigot pentru alela dominantă. Genotipul unui individ care prezintă fenotip dominant poate fi totuși determinat după fenotipurile și frecvența lor analizate la descendenții pe care acesta îi produce în urma încrucișării sale cu un individ homozigot recesiv pentru acea pereche de factori ereditari. Această încrucișare se numește *test cross*. Fenotipurile și frecvența lor la descendenții rezultați din test cross corespund tipurilor și frecvențelor genotipice ale gameților produși de organismul al cărui genotip este necunoscut. Cînd individul testat a avut unul dintre părinți sau strămoși recesiv pentru perechea de factori ereditari analizată, test crossul se mai numește *back cross* sau *retroîncrucișare*. Dominanța face ca numărul claselor fenotipice să fie mai mic decît numărul claselor genotipice. De asemenea dominanța cauzează *regresia*, adică părinții care sînt fenotipic extremă pentru un caracter cantitativ (productivitate) dau descendenți care sînt în medie mai puțin extremi. Deoarece dominanța maschează prezența genelor recesive, o încrucișare dintre doi indivizi de același fenotip (de exemplu cu blana neagră, culoarea fiind un caracter cantitativ A) luați la întîmplare poate produce descendenți de culoare deschisă (a). Această tendință a părinților (A) care fenotipic sînt extreme, de a da descendenți care nu sînt extreme se numește *regresie*.

La organismele poliploide fenomenul de segregare este mai complicat, în sensul că raportul de segregare este de 35 A : 1 a,

deci frecvenţa cu care apare organismul homozigot recesiv este foarte mică (tabelul 4)

Tabelul 4

Rezultatul încrucişării a două organisme poliploide reprezentînd linii pure genetic (homozigote AAAA x aaaa) în a doua generaţie (AAaa × AAaa)

Gameţi ♀ \ ♂	1AA	4Aa	1aa
1AA	1AAAA	4AAAa	1AAaa
4Aa	4AAAa	16AAaa	4Aaaa
1aa	1AAaa	4Aaaa	1aaaa

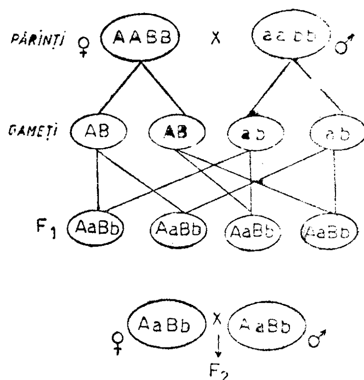
Cînd se consideră perechi de factori ereditari plasaţi pe cromozomi diferiţi se constată că apar aspecte noi ale comportării acestora.

4.2. DIHIBRIDAREA

Mendel şi-a propus să urmărească modul cum se transmit simultan două perechi de factori ereditari: una care determină forma bobului (*A*=neted; *a*=zbîrcit) şi alta care determină culoarea bobului (*B*=galben; *b*=verde). Pentru aceasta a încrucişat un soi pur cu boabe netede şi galbene *(AABB)* cu un soi pur care prezenta boabe zbîrcite şi verzi *(aabb)*. Asemenea experienţă de încrucişare în care se iau în consideraţie două perechi de caractere se numeşte *dihibridare*. În prima generaţie a obţinut o populaţie hibridă pentru ambele caractere *(AaBb)*, care prezenta caracterele de bob neted şi galben, ceea ce înseamnă că acestea sînt caracterele dominante, cele de bob zbîrcit şi verde fiind deci caractere recesive. Pentru a obţine a doua generaţie a lăsat să se autopolenizeze plantele dublu-hibride din prima generaţie după schema din fig. 46.

Analizînd tabelul, numit în unele lucrări mai vechi în mod sugestiv „şahul combinărilor mendeliene“ sau tabelul lui Punett se constată că prin segregarea factorilor ereditari în meioză derivă patru categorii distincte de gameţi masculi şi tot

atîtea de gameți femeli. În procesul de fecundare are loc unirea pe bază de probabilitate a gameților masculi cu cei femeli, adică fiecare gamet mascul (sau femel) are șanse egale cu ale celorlalți 3 de a se uni cu fiecare din gameții de sex opus. Rezultă 16 posibilități de combinare, respectiv 16 combinații de factori ereditari. În virtutea relației dominanță-recesivitate, oriunde se întîlnesc factorii ereditari dominanți *A* respectiv *B* va fi exprimat în fenotip caracterul respectiv (neted sau galben). Cînd ei sînt prezenți simultan în același genotip, vor fi exprimate fenotipic atît caracterul neted cît și caracterul galben. Caracterele recesive vor fi exprimate fenotipic doar în cazul în care factorii ereditari recesivi (*a* și *b*) nu sînt în prezența factorilor ereditari dominanți corespunzători (*A* și *B*).



gameți ♀\♂	A B	A b	a B	a b
AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb
Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb
aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

Fig 46. **Dihibridarea (Segregarea independentă a perechilor de factori ereditari).**

Din analiza celor 16 combinări de factori ereditari se constată următoarele :

9/16 prezintă simultan ambii factori dominanți (*AB*) condiționînd expresia caracterului neted și galben ;

3/16 prezintă un factor ereditar dominant și altul recesiv condiționînd dezvoltarea unui caracter dominant și a altui caracter recesiv (*Ab* = bob neted și verde) ;

3/16 prezintă celălalt factor ereditar dominant și pe celălalt recesiv (*aB* = bob zbîrcit și galben) ;

1/16 prezintă ambii factori ereditari recesivi condiționînd exprimarea fenotipică a caracterelor recesive de bob zbîrcit și neted.

De fapt, în experiența sa, Mendel a obținut în F_2 556 de plante dintre care 315 au produs boabe netede și galbene, 108 boabe netede și verzi, 101 boabe zbîrcite și galbene și 32 boabe zbîrcite și verzi.

Deoarece probabilitatea apariţiei unui caracter dominant este de 3/4 iar a unuia recesiv este de 1/4, şi probabilitatea apariţiei simultane a două evenimente **independente** este egală cu produsul probabilităţii apariţiei lor separate (individuale) este uşor să desprindem de unde rezultă raportul de segregare 9 :3 :3 :1. Probabilitatea apariţiei lui A este de 3/4, a lui B tot de 3/4, a lui a de 1/4 iar a lui b tot de 1/4. Probabilitatea apariţiei simultane a lui A şi B este de $3/4 \times 3/4 = 9/16$.

$AB = 3/4 \times 3/4 = 9/16$ bob neted şi galben

$Ab = 3/4 \times 1/4 = 3/16$ bob neted şi verde

$aB = 3/4 \times 1/4 = 3/16$ bob zbîrcit şi galben

$ab = 1/4 \times 1/4 = 1/16$ bob zbîrcit şi verde

De fapt raporturile rezultă din desfacerea expresiei

$$\left(\frac{3}{4}A + \frac{1}{4}a\right) \times \left(\frac{3}{4}B + \frac{1}{4}b\right).$$

Admiţînd că p reprezintă probabilitatea evenimentului X (gameţi nerecombinaţi) iar q probabilitatea evenimentului Y (gameţi recombinaţi) respectiv contaprobabilitatea evenimentului X $(1-p)$ se poate calcula frecvenţa apariţiei recombinărilor în cazul unei încrucişări dintre organisme dublu heterozigote ($AaBb \times AaBb$). Rezultă patru tipuri de gameţi femeli şi patru tipuri de gameţi masculi. Dintre acestea, două sînt nerecombinante (AB şi ab) şi două sînt recombinate (Ab şi aB). Probabilitatea apariţiei unui eveniment este egală cu raportul dintre numărul cazurilor favorabile şi numărul cazurilor posibile. Probabilitatea apariţiei simultane a două evenimente este egală cu produsul probabilităţii apariţiei lor separate. Probabilitatea $X = p = \frac{1}{2}$.

Probabilitatea $Y = q = \frac{1}{2}$; $p + q = 1$; $q = 1 - p$; $p = 1 - q$

Frecvenţa gameţilor nerecombinaţi $= \frac{1-p}{2}$

Frecvenţa gameţilor recombinanţi $= \frac{p}{2}$

Pentru a calcula probabilitatea de apariţie a unui anumit fenotip se procedează astfel: pentru fenotipul Ab:

$$\frac{p^2}{4} + \frac{p(1-p)}{4} + \frac{p(1-p)}{4} = \frac{p^2 + p - p^2 + p - p^2}{4} = \frac{2p - p^2}{4} = \frac{p(2-p)}{4}$$

Tot astfel se procedează în vederea calculării probabilității de apariție a celorlalte fenotipuri (*AB*, *aB* și *ab*) folosind datele din tabelul 5.

Analiza fenotipică a indivizilor din generația F_2 a arătat cîteva aspecte importante privind comportamentul factorilor ereditari. În primul rînd s-a dovedit încă o dată realitatea segregării factorilor ereditari. Dar mai importantă este apariția unor categorii noi de indivizi. Astfel, în dihibridare s-a pornit de la două tipuri de plante: cu bob neted și galben (*AB*) și cu bob zbîrcit și verde (*ab*) și în F_2 au apărut pe lîngă aceste două tipuri inițiale încă două tipuri care prezentau un caracter de la un genitor și alt caracter de la celălalt genitor. Avea loc deci la descendenți o dezbinare a cuplurilor de caractere parentale. Singura explicație plauzibilă era următoarea:

La nivelul hibridului din prima generație (*AaBb*) perechea de factori ereditari care determină forma bobului (*Aa*) segregă independent de perechea de factori ereditari care determină culoarea bobului (*Bb*) și astfel se creează posibilitatea probabilistică a asortării independente a factorilor ereditari astfel încît în același gamet va putea trece un factor ereditar de la o pereche și un factor ereditar de la cealaltă pereche (fig. 47). Acești gameți se numesc *gameți recombinați*. Dacă nu ar fi o segregare independentă a celor două perechi de factori ereditari, atunci ar lua naștere doar două categorii de gameți și anume gameții nerecombinanți *AB* și *ab* care ar condiționa formarea a două categorii de organisme cu bob neted și galben

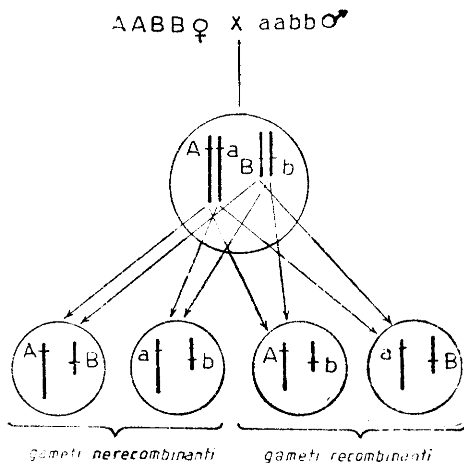


Fig. 47. Segregarea independentă a perechilor de cromozomi însoțită de segregarea (disjuncția) independentă a perechilor de factori ereditari, evenimente care se presupun reciproc și se suprapun, desfășurîndu-se în meioză, la formarea gameților.

Tabelul 5

Probabilităţile de apariţie a diferitelor fenotipuri

Gameţi ♀ \ ♂	AB $\left(\frac{1-p}{2}\right)$	Ab $\left(\frac{p}{2}\right)$	aB $\left(\frac{p}{2}\right)$	ab $\left(\frac{1-p}{2}\right)$
AB $\left(\frac{1-p}{2}\right)$	ABAB $\frac{1-p}{2}\cdot\frac{1-p}{2}=\frac{(1-p)^2}{4}$	ABAb $\frac{p}{2}\cdot\frac{1-p}{2}=\frac{p(1-p)}{4}$	ABaB $\frac{1-p}{2}\cdot\frac{p}{2}=\frac{p(1-p)}{4}$	ABab $\frac{1-p}{2}\cdot\frac{1-p}{2}=\frac{(1-p)^2}{4}$
Ab $\left(\frac{p}{2}\right)$	ABAb $\frac{p}{2}\cdot\frac{1-p}{2}=\frac{p(1-p)}{4}$	AbAb $\frac{p}{2}\cdot\frac{p}{2}=\frac{p^2}{4}$	AbaB $\frac{p}{2}\cdot\frac{p}{2}=\frac{p^2}{4}$	Abab $\frac{p}{2}\cdot\frac{1-p}{2}=\frac{p(1-p)}{4}$
aB $\left(\frac{p}{2}\right)$	ABaB $\frac{p}{2}\cdot\frac{1-p}{2}=\frac{p(1-p)}{4}$	AbaB $\frac{p}{2}\cdot\frac{p}{2}=\frac{p^2}{4}$	aBaB $\frac{p}{2}\cdot\frac{p}{2}=\frac{p^2}{4}$	aBab $\frac{p}{2}\cdot\frac{1-p}{2}=\frac{p(1-p)}{4}$
ab $\left(\frac{1-p}{2}\right)$	ABab $\frac{1-p}{2}\cdot\frac{1-p}{2}=\frac{(1-p)^2}{4}$	Abab $\frac{p}{2}\cdot\frac{1-p}{2}=\frac{p(1-p)}{4}$	aBab $\frac{1-p}{2}\cdot\frac{p}{2}=\frac{p(1-p)}{4}$	abab $\frac{1-p}{2}\cdot\frac{1-p}{2}=\frac{(1-p)^2}{4}$

(AB) și cu bob zbîrcit și verde *(ab)*, adică s-ar păstra tipurile inițiale, parentale, de organisme.*

Cunoscînd că în meioză are loc disjuncția independentă a perechilor de cromozomi omologi și știind că factorii ereditari sînt plasați pe cromozomi, este ușor de tras concluzia că pentru a segrega independent una de alta, cele două perechi de factori ereditari *Aa* și *Bb* trebuie să fie plasate pe perechi diferite de cromozomi.

Segregarea independentă a două perechi de factori ereditari, respectiv de caractere în care apare raportul de segregare 9 : 3 : 3 : 1 poate fi ușor redusă la segregarea a două caractere alelomorfe, dacă se consideră segregarea separată a fiecărei perechi de caractere. Astfel, considerînd perechea *Aa*, făcînd abstracție de perechea *Bb* raportul de segregare va fi

$\frac{9}{16} + \frac{3}{16} = \frac{12}{16}$ pentru factorul *A* și

$\frac{3}{16} + \frac{1}{16} = \frac{4}{16}$ pentru factorul *a* sau simplificînd va fi deci

$\frac{3}{4} : \frac{1}{4}$ adică 3*A* la 1*a*

Situația este identică pentru perechea *Bb*, cînd se face abstracție de perechea *Aa*.

Pentru a căpăta o anumită certitudine, mai exact pentru a se asigura statistic că segregarea este o lege, Mendel a aplicat testul *chi-pătrat* $\chi^2 = \Sigma \frac{d^2}{e}$ în care se introduc valorile așteptate potrivit raportului de sgregare stabilit în alte experiențe (9 : 3 : 3 : 1) și valorile care se determină în experiența curentă actuală.

* Disjuncția independentă a perechilor de factori ereditari importantă și în practica ameliorării face ca din organisme dublu-heterozigote de tip AaBb, prin autofecundare, să se obțină pe lîngă organismele dublu homozigote inițiale (AABB și aabb) noi categorii de organisme dublu homozigote (AAbb și aaBB) ca și alte categorii homozigote pentru o singură pereche de caractere (Aabb sau aaBb). Acestea, alături de organismele recombinante, pot să reprezinte obiective importante în programele de ameliorare.

Astfel, dacă într-o experiență de tip $AABB \times aabb$ se obțin următoarele date (tabelul 6)

Tabelul 6

Calculul lui χ^2 pentru segregarea în F_2 a raportului 9 : 3 : 3 : 1

Valori	AB	Ab	aB	ab	Total
observate (0)	2834	920	951	287	4992
așteptate (e)	2808	936	936	312	4992
Diferența (d=0−e)	26	16	15	25	$\chi^2 = \Sigma \frac{d^2}{e} = 2{,}75$
d^2	676	256	225	625	
$\frac{D^2}{e}$	0,24	0,27	0,24	2,00	

valoarea lui χ^2 de 2,75 pentru cele 3 grade de libertate (4 clase fenotipice — 1) corespunde la o probabilitate de transgresiune care este mai mare de 0,30 dar mai mică de 0,50 ($p = 0{,}50 - 0{,}30$). Aceasta înseamnă că din 100 de repetări ale unei experiențe date, la 30 pînă la 50 dintre ele vor apare devieri probabile de la raportul 9 : 3 : 3 : 1, egale sau mai mici decît cele observate. Cum valoarea lui p este clar mai mare de 0,05, rezultatele observate pentru raportul 9 : 3 : 3 : 1 sînt în acord cu cele așteptate pentru asortarea independentă a două perechi de alele. Repetabilitatea lor cu o asemenea frecvență nu se poate datora întîmplării ci mai curînd unor cauze intrinsece a desfășurării mecanismului ereditar la nivelul celulei după anumite legi exacte. Astfel, segregarea apare legic determinată și statistic asigurată. Considerarea caracterului statistic al fenomenului ereditar se bazează pe admiterea că fiecare dintre produșii meiozei (gameți) prezintă șansă egală de a participa în procesul de fecundare. Marile evenimente genetice se desfășoară însă în meioză.

Cea de-a doua lege elaborată de Mendel este *legea asortării sau disjuncției independente* a perechilor de factori ereditari (gene) și se referă la gene care sînt plasate pe cromozomi neomologi.

Niciodată gameții nu vor fi *Aa, Bb, ABb* etc. decît numai în cazurile anormale, rare cînd are loc nondisjuncția meiotică a cromozomilor care este însoțită în consecință de nesegregarea factorilor ereditari. Cînd se fac încrucișări între două soiuri

pure, luîndu-se în considerare trei perechi de factori ereditari *(AA, BB, CC × aa bb cc)* tabloul segregării este mult mai complex. Asemenea experiențe se numesc experiențe de *trihibridare*. Se obțin cîte 8 tipuri diferite ca genotip de gameți atît masculi cît și femeli și rezultă 64 de combinații dînd un raport de segregare de 27 : 9 : 9 : 9 : 3 : 3 : 3 : 1, ceea ce înseamnă că frecvența de apariție a formelor homozigote este proporțional mai redusă decît în monohibridare sau dihibridare.

Segregarea independentă a perechilor de factori ereditari, respectiv a perechilor de cromozomi reprezintă în sine un mecanism de *recombinare genetică intercromozomală*. Acest tip de recombinare genetică caracterizează doar organismele eucariote căci doar ele conțin mai multe grupe de lincaj, respectiv mai mulți cromozomi neomologi. Recombinarea intercromozomală reprezintă segregarea de cromozomi întregi în meioză care determină segregarea de gene nelincate adică de perechi de alele localizate în cromozomi neomologi.

Fenomenul disjuncției independente a perechilor de cromozomi respectiv a perechilor de factori ereditari este de fapt un fenomen predeterminat de așezarea randomizată a omologilor din bivalenți față de planul ecuatorial al plăcii metafazice. În virtutea acestui fapt, probabilitatea ca toți cromozomii de origine maternă de la nivelul tuturor bivalenților să se așeze deasupra planului ecuatorial sau toți cromozomii de origine paternă de la nivelul tuturor bivalenților să se așeze sub planul ecuatorial al plăcii metafazice este egală cu probabilitatea ca acești cromozomi de origini diferite să se așeze unii deasupra, alții dedesubtul planului ecuatorial. Asemenea așezare randomizată a cromozomilor de origine maternă și paternă față de planul ecuatorial al plăcii metafazice în metafaza I condiționează distribuția independentă a perechilor de cromozomi, respectiv de factori ereditari spre poli în anafaza I. Din această cauză este corectă interpretarea în termeni de predeterminare pe care o dăm fenomenului de disjuncție independentă a perechilor de factori ereditari. În absența unei asemenea predeterminări factorii ereditari de origine maternă *(AB)* ar migra totdeauna la un pol, pe cînd cei de origine paternă *(ab)* ar migra la polul opus, rezultînd doar două tipuri de gameți *(AB*, respectiv *ab)*, neexistînd posibilitatea apariției de gameți recombinanți *(Ab* și *aB)*.

Distribuția polarizată a cromozomilor particulari la un pol al fusului de diviziune are loc foarte rar și duce la o asortare nerandomizată și la o segregare nerandomizată de markeri ge-

netici. Segregarea independentă a perechilor de factori ereditari respectiv a perechilor de cromozomi care asigură recombinarea genetică intercromozomală face ca probabilitatea ca doi gameţi să fie asemănători să fie foarte mică. Astfel, considerînd omul, care are în garnitura diploidă 46 cromozomi, iar în gameţi 23 de cromozomi şi admiţînd că în fiecare cromozom s-ar afla doar o genă, probabilitatea ca doi gameţi să fie identici genotipic este de $\left(\frac{1}{2}\right)^{23}$ iar ca doi indivizi umani să fie identici genetic este de $\left(\frac{1}{2}\right)^{46}$. Aceasta reprezintă o probabilitate extrem de mică şi este posibil ca în populaţia umană de la originile sale să nu fi existat doi indivizi asemănători. Excepţie ar putea să facă gemenii monozigoţi care pot avea o constelaţie identică de factori ereditari nucleari dar şi în acest caz pot să apară diferenţe în constelaţia de factori ereditari extranucleari (mitocondriali de exemplu), distribuirea mitocondriilor în timpul diviziunii fiind mai puţin echilibrată. Distribuţia echilibrată a factorilor ereditari nucleari este asigurată de mecanismul mitotic de diviziune.

Dar probabilitatea ca doi indivizi ai unei specii date să fie identici este şi mai mică dacă luăm în consideraţie faptul că pe fiecare cromozom nu se află o singură genă ci mai multe gene. Considerînd specia umană reiese că fiecare individ este o entitate genetică irepetabilă.

Cercetările lui Mendel au pus piatra de temelie a Geneticii. Publicate într-o revistă de slabă circulaţie sub titlul „Versuche über Pflanzenhybriden“ ele au fost date uitării. Savanţii timpului erau încă cu atenţia îndreptată spre teoria lui Darwin asupra originii speciilor prin selecţie naturală, uitînd de alte descoperiri tot atît de geniale. Se spune că Mendel nu a avut loc în secolul lui. El a fost pur şi simplu mutat în secolul nostru. Destinul lui ştiinţific a fost şi mai dramatic dacă ne gîndim că Mendel a murit cu gîndul că ceea ce a descoperit el s-ar putea să nu fie o realitate a naturii. Acest fapt s-a datorat efectuării unor experienţe de hibridare la *Hieracium*, plantă apomictică, care nu are deci o meioză tipică şi, cum este şi firesc, nu s-a supus legilor mendeliene ale eredităţii.

Cercetările lui Mendel au revoluţionat biologia. Pentru prima dată, după 23 de secole, era dărîmată concepţia lui Hippocrate despre transmiterea directă a caracterelor de la părinţi la descendenţi.

Reluate la alte plante şi la animale, legile descoperite de Mendel, privind comportarea factorilor ereditari s-au dovedit universal aplicabile, iar excepţiile nu au făcut decît să confirme regula, extinzînd şi dezvoltînd concepţia lui Mendel despre ereditate.

4.3. EXCEPŢII DE LA RAPORTURILE MENDELIENE DE SEGREGARE

CAZURI PARTICULARE DE EREDITATE

4.3.1. *DOMINANŢA INCOMPLETĂ SAU SEMIDOMINANŢA*

Correns, redescoperitorul legilor lui Mendel alături de Tschermak şi Hugo de Vries, încrucişînd un soi de *Mirabilis jalapa* cu flori roşii *(AA)* cu un soi cu flori albe *(aa)* a obţinut în prima generaţie hibridă *(Aa)* doar plante care făceau flori roz. Prin autopolenizarea acestora *(Aa × Aa)* a obţinut în F_2 un raport de segregare diferit de cel mendelian obişnuit (3 : 1).

25% 50% 25%
Acesta a fost de 1: *AA* : 2 *Aa* : 1 *aa*. După cum se vede, în acest
roşu roz alb

caz raportul de segregare genotipică corespunde cu raportul de segregare fenotipică, iar homozigoţii dominanţi *(AA)* se exprimă fenotipic diferit (roşu) de heterozigoţi (roz). Gena *A* nu se manifestă ca total dominantă asupra lui „*a*" iar „*a*" nu se manifestă ca total recisivă faţă de *A*. Cele două gene se manifestă cu intensitate egală. Fenomenul s-a numit *dominanţă incompletă* sau *semidominanţă*. În experienţele pe mazăre era o dominanţă completă şi segregarea în acest caz s-a numit segregare de tip *Pisum*. La Mirabilis este vorba de o dominanţă incompletă iar segregarea s-a numit de *tip Zea* căci fenomenul a fost prima dată observat la porumb prin încrucişarea unei varietăţi cu boabe albastre cu o varietate cu boabe albe din care au ieşit plante hibride cu boabe violacee. Tot astfel din încrucişarea unor găini cu penaj negru cu găini cu penaj alb, rezultă găini de Andaluzia care au penajul albăstrui. Cum găinile de *Andaluzia* (cu penajul albăstrui) sînt impure genetic (hibride) ele segregă în fiecare generaţie, din care cauză n-a fost posibilă crearea unei rase de găini cu penajul albăstrui.

La om, cel mai cunoscut exemplu de dominanţă incompletă este cel al anemiei falciforme. Gena mutantă *s* condiţionează

sinteza unei forme mutante a catenei β a hemoglobinei și face ca să apară hemoglobina *HbS* în locul hemoglobinei normale *HbA*.

Indivizii homozigoți *s/s* de regulă mor înainte de maturitate, prezentînd anemia falciformă. Heterozigoții *S/s* sînt viabili și prezintă eritrocite falciforme, dar anemia lor nu este atît de severă ca la indivizii *s/s*, prezentînd numai tulburări de respirație la altitudini mari, unde cantitatea de oxigen e redusă. Cînd hemoglobina unor asemenea indivizi este analizată electroforetic se constată că aceasta conține cantități echimolare de catene normale și de catene mutante β. Acesta ar fi un caz de *codominanță*, dacă se consideră „fenotipul in vitro". Aceasta înseamnă că ambele gene *S* și *s* funcționează cu aproximativ aceeași eficiență. Dominanța lui *S* este incompletă, dar adesea se consideră că cele două alele *S* și *s* sînt codominante.

4.3.2. *SUPRADOMINANȚA*

Cînd fenotipul heterozigotului *(Aa)* depășește prin caracteristicile sale cantitative ambii genitori homozigoți se înregistrează fenomenul de *supradominanță*. Supradominanța s-a înregistrat în cele mai multe cazuri în care se analizează mărimea, productivitatea și viabilitatea descendenților. De exemplu, la Drosophila, gena care determină culoarea albă a ochilor este recesivă *(w)* iar gena care determină culoarea roșie, normală a ochilor este dominantă *(w^+)*. În stare heterozigotă *(w^+/w)* se constată o creștere notabilă a cantității de pigmenți (în special a sepiapterinei) atît față de homozigotii cu ochii albi *(w/w)* cît și față de homozigoții normali *(w^+/w^+)*.

4.3.3. *CODOMINANȚA*

În cazul codominanței genotipul heterozigot dă naștere la un fenotip diferit față de cele determinate de genotipurile homozigote. Acest fenomen se înregistrează și în semidominanță (dominanță incompletă). În cazul codominanței însă, spre deosebire de semidominanță, genele alele nu au raport de dominanță sau recesivitate, ele fiind dominante față de alte gene

dintr-o serie de mai multe alele, dar codominante una în raport cu cealaltă.

De exemplu, la om grupele sanguine au un determinism genic polialelic. Grupa sanguină A are formula genotipică l^Al^A homozigot dominant sau l^Al^0 — heterozigot.

Grupa sanguină B are determinismul genetic L^Bl^B respectiv l^Bl^0.

Grupa sangvină 0 are determinismul genetic l^0l^0.

În toate aceste cazuri alelele l^A şi l^B se manifestă ca dominante faţă de alela l^0 care este recesivă. Cînd însă cele două alele dominante se întîlnesc în genotipul indivizilor cu grupa sangvină AB, care are deci formula l^Al^B, nici una dintre ele nu manifestă dominanţă sau recesivitate faţă de cealaltă. Ele codomină şi condiţionează apariţia unui nou fenotip (grupa sangvină AB) diferit de cel al părinţilor (mama — grupa sangvină A, tata — grupa sangvină B sau viceversa).

Un exemplu tipic de codominanţă este locusul esterazei-6 de la *Drosophila melanogaster*. Una din cele două alele ale acestei gene produce o formă *F* ce migrează rapid *(fast migrating)* pe gelul electroforetic iar cealaltă alelă produce o formă *S* a enzimei esterazice, ce migrează încet *(slow migrating)*.

Analiza extractelor din indivizi heterozigoţi, desemnaţi *F/S* arată că cele două tipuri de enzimă sînt prezente în cantităţi egale. Prezenţa unei proteine nu are vreun efect aparent asupra cantităţii sau activităţii celeilalte enzime. Asemenea enzime se numesc *isozime*.

Majoritatea izozimelor sînt determinate printr-o interacţiune alelică de tip codominanţă, şi ele se pun în evidenţă în extracte celulare nu prin analiză fenotipică propriu-zisă a întregului organism căci indivizii *F/F, F/S, S/S* nu pot fi deosebiţi după fenotip, ci doar prin analiză electroforetică, tipurile homozigote prezentînd o singură bandă electroforetică pe cînd tipul heterozigot prezintă două benzi, una *F*, alta *S*.

4.3.4. *ALELE MULTIPLE (POLIALELIA)*

Alelele reprezintă alternative ale aceleiaşi gene, controlînd expresii diferite ale aceluiaşi caracter. În urma mutaţiei genei de tip sălbatic care de regulă este dominantă *(A)* apare alela sa recesivă *(a)*. Mutaţia este mult mai rară în sens invers

$(a \to A)$. Genele la organismele diploide se află sub formă de pereche (alele) și sînt dispuse în același locus pe cromozomi omologi. Fiecare din cei doi cromozomi omologi ai unei perechi va conține în locusul corespunzător doar cîte o alelă dintr-o pereche de alele ale unei gene, fie *A*, fie *a*. Niciodată cele două alele nu vor fi plasate (suprapuse) în același locus, pe același cromozom.

Procesul de mutație s-a desfășurat progresiv în timp și el a dus mai întîi la apariția din gena inițială *A* a alelei sale recesive „a". Dar într-o altă etapă, din aceeași genă inițială *A*, a putut deriva alela a_1 care controlează o altă expresie a aceluiași caracter. Mutația genei *A*, desfășurată în diferite sensuri a determinat apariția unei serii de alele a_1, a_2, a_3 ... a_n, care controlează variația expresiei aceluiași caracter. Asemenea gene poartă numele de *polialele* sau *alele multiple*. Seria a_1, a_2, a_3 ... a_n este o serie polialelă. Toate aceste alele ocupă același locus pe cromozomii omologi. Aceasta nu înseamnă că toate alelele vor fi plasate în același timp, într-un singur locus pe perechea de cromozomi omologi. Fenomenul polialeliei este un fenomen populațional, ceea ce înseamnă că la unii indivizi ai populației considerate, pe o pereche de cromozomi omologi se află într-un locus precis delimitat perechea *AA;* la alți indivizi pe aceeași pereche de cromozomi omologi, în același locus, se va afla perechea a_1a_1, la alții a_2a_2 ș.a.m.d. La indivizii heterozigoți pe un cromozom omolog, într-un locus dat se va afla alela dominantă *A*, iar pe celălalt cromozom omolog, în același locus (locus corespunzător) se va afla fie alela recesivă a_1, fie alela recesivă a_2 etc.

Cazul citat la codominanță este în același timp un caz de polialelie. Cele trei gene I^A, I^B și I^0, ocupă același locus pe cromozomii omologi și controlează variația grupei sangvine în populația umană, făcînd ca unii indivizi să aibă grupa sangvină A, alții grupa sangvină B, alții grupa sangvină AB și alții grupa sangvină 0.

Există un principiu fundamental al imunologiei potrivit căruia un organism, în condiții normale, nu va produce anticorpi împotriva sa. Astfel, dacă una dintre proteinele produse de un organism este antigenul-*P*, atunci anticorpul anti-*P* nu se va produce în serul aceluiași organism. Eritrocitele umane prezintă antigene, pe cînd serul sangvin conține anticorpi. Cînd serul de la un individ cu grupa sangvină *A* se amestecă cu eritrocitele de la un individ cu grupa sangvină *B*, apare reacția de aglutinare. Tot la fel se întîmplă cînd serul de la indivizi cu

grupa *B* se amestecă cu eritrocitele de la indivizi cu grupa sangvină *A*. Pe de altă parte, amestecul de ser și de celule de la același individ, sau mai exact de la indivizi care au aceeași grupă sangvină nu determină coagularea. Aceste răspunsuri diferite sînt determinate de o clasă de antigene localizată pe suprafața eritrocitelor. Astfel, alela dominantă I^A specifică antigenul *A* și anticorpi *anti-B*, alela dominantă I^B specifică antigenul *B* și anticorpi *anti-A*, iar alela recesivă I^0 nu specifică nici o structură antigenică.

Analiza biochimică a evidențiat faptul că antigenul A este o α-N-acetil-D-galactozamină, atașată de un glicolipid sau glicoproteină, aflate la suprafața eritrocitului. Antigenul *B* este o α-D-galactoză. Persoanele cu grupa sangvină *A* au enzima α-N-*acetilgalactozamiltransferaza* care atașează galactozamina la lipidul sau proteina de la suprafața eritrocitului. Persoanele cu grupa sangvină B posedă o *α-D-galactosiltransferază* care atașează galactoza la compușii de pe suprafața eritrocitului.

Persoanele cu grupa sangvină AB au ambele tipuri de antigene și deci ambele tipuri de enzime, aparent în cantități echimolare (alelele I^A și I^B sînt codominante).

Serul persoanelor cu grupa sangvină *AB* nu conține anticorpi anti-*A*, nici anticorpi anti-*B*, din care cauză persoanele cu grupa sangvină *AB* sînt primitori universali de transfuzii de sînge.

Alela I^0 nu condiționează sinteza vreunei enzime și persoanele cu grupa sangvină *0* nu prezintă antigene *A* și nici antigene *B*. Eritrocitele lor sînt neutre, dar în serul lor se află atît anticorpi anti-*A* cît și anticorpi anti-*B*.

Pentru detectarea celor patru fenotipuri se folosește reacția de aglutinare (fig. 48) cu două tipuri de antiser (anticorpi) anti-*A* și anti-*B*, conform tabelului 7.

Ierarhia dominanței celor trei alele este $(I^A = I^B) > I^0$ (tabel 8). De regulă o alelă recesivă (precum este alela I^0) care specifică o proteină inactivă este rară comparativ cu alela sa dominantă (așa cum sînt alelele I^A sau I^B). În cazul acestor alele însă apare o excepție de la regulă, căci persoanele cu grupa sangvină 0 sînt mult mai frecvente în populația umană decît persoanele cu alte grupe sangvine, ceea se înseamnă că frecvența genei I^0 în populația umană este mare.

Există o anumită distribuție geografică a grupelor sangvine în populația umană. Cea mai constantă distribuție o are grupa B. Frecvența cea mai mare este înregistrată în Asia centrală și este de 25—30%. De aici, frecvența descrește în toate di-

Donor (antigene)		Receptor (anticorpi) Reacția serului din grupa:			
Grupa de sînge	Genotipul	A	B	AB	0
A	$I^A I^A$ (AA) sau $I^A I^0$ (A0)				
B	$I^B I^B$ (BB) sau $I^A I^B$ (B0)				
AB	$I^A I^B$ (AB)				
0	$I^0 I^0$ (00)				

Fig. 48. Acțiunea serului de la persoane cu grupe sangvine variate (receptori) asupra diferitelor tipuri de eritrocite (donori). Aglutinarea celulelor indică reacția anticorpilor serului cu antigenele celulare.

Tabelul 7

Reacția de aglutinare în stabilirea celor patru fenotipuri ale grupei sangvine

Genotipul	Fenotipul (Grupa sanguină)	Antigen	Anticorpi	Tipul de eritrocite aglutinate	Transfuzii acceptate de la:
${}_1A_1A$ sau ${}_1A_10$	A	Galactozamina (A)	anti-B	B, AB	A și 0
${}_1B_1B$ sau ${}_1B_10$	B	Galactoza (B)	anti-A	A, AB	B și 0
${}_1A_1B$	AB	Galactozamina (A)+ Galactoza (B)	nici un tip	Nici unul	A, B, AB și 0 (primitor universal)
${}_10_10$	0	Nici un tip	anti-A + + anti-B	A, B și AB	Numai de la 0 (donator universal)

Stabilirea grupelor sanguine ale copiilor rezultați din căsătoria unor persoane cu diferite grupe sangvine se face după următoarea schemă :

Grupa sanguină (fenotip) a părinților	Formula genotipică posibilă	Formula genotipică a copiilor	Grupa sanguină (fenotipul) a copiilor
0 × 0	$1^0 1^0 \times 1^0 1^0$	$1^0 1^0$	0
0 × A	$1^0 1^0 \times 1^A 1^A$	$1^A 1^0$	A
	$1^0 1^0 \times 1^A 1^0$	$1^A 1^0$ şi $1^0 1^0$	A sau 0
0 × B	$1^0 1^0 \times 1^B 1^B$	$1^B 1^0$	B
	$1^0 1^0 \times 1^B 1^0$	$1^B 1^0$ şi $1^0 1^0$	B sau 0
0 × AB	$1^0 1^0 \times 1^A 1^B$	$1\ 1^0$ şi $1^B 1^0$	A sau B
A × A	$1^A 1^A \times 1^A 1^A$	$1^A 1^A$	A
	$1^A 1^A \times 1^A 1^0$	$1^A 1^A$ şi $1^A 1^0$	A
	$1^A 1^0 \times 1^A 1^0$	$1^A 1^A$ şi $1^0 1^0$	A sau 0
A × B	$1^A 1^A \times 1^B 1^B$	$1^A 1^B$	AB
	$1^A 1^0 \times 1^B 1^B$	$1^A 1^B$ şi $1^B 1^0$	AB, B
	$1^A 1^0 \times 1^B 1^0$	$1^A 1^B$, $1^A 1^0$. $1^B 1^0$. $1^0 1^0$	A, B, AB, 0
	$1^A 1^A \times 1^B 1^0$	$1^A 1^B$, $1^A 1^0$	AB, A
B × B	$1^B 1^B \times 1^B 1^B$	$1^B 1^B$	B
	$1^B 1^B \times 1^B 1^0$	$1^B 1^B$ şi $1^B 1^0$	B
	$1^B 1^0 \times 1^B 1^0$	$1^B 1^B$, $1^B 1^0$ şi $1^0 1^0$	B sau 0
B × AB	$1^B 1^B \times 1^A 1^B$	$1^A 1^B$ şi $1^B 1^B$	AB sau B
	$1^B 1^0 \times 1^A 1^B$	$1^A 1^B$, $1^B 1^0$, $1^A 1^0$, $1^B 1^B$	AB, B, A
AB × AB	$1^A 1^B \times 1^A 1^B$	$1^A 1^B$, $1^A 1^A$, $1^B 1^B$	A, B, AB

recțiile, ajungînd în Franța și Anglia la 5—10%, iar în populațiile naturale ale Australiei și Americii de sud este foarte mică sau nulă.

De asemenea, o distribuție asemănătoare se înregistrează în Africa, unde frecvența genei 1^B este cea mai mare în Congo, de unde descrește în toate direcțiile.

Gena 1^A, prezintă frecvența cea mai mare în Europa de Vest, Australia și unele zone din America de Nord. Modelul său de distribuție este mai universal, dar mai puțin regulat. O frecvență mai mare a sa se înregistrează în populațiile din Tibet, la boșimanii din Africa de sud, pigmeii din Congo, negrii din Filipine și unele populații din sudul Indiei.

Gena 1^0 este cea mai frecventă în toată lumea, dar cea mai înaltă frecvență (75%) apare în populațiile naturale din America (indieni americani), în unele regiuni ale Africii, Australia și Orientul mijlociu. În Europa ea are o frecvență de 55—60%. Unele triburi de indieni americani prezintă frecvența de 100% a genei 1^0. Altele au o frecvență de 49% 1^0 și 51% 1^A sau 87% 1^0 și 13% 1^A.

În cazul căsătoriilor $A \times 0$, $B \times 0$ sau $AB \times 0$, în care femeia are grupa sangvină 0 apare o reducere cu 25% a numărului de copii cu grupa sangvină *A* sau *B*. Indivizii cu grupa sangvină *0* produc în serul sangvin anticorpi *A* și *B*. În timpul vieții intrauterine, unele celule sangvine de tip *A*, formate de foetusul A, intră în circulația sangvină a mamei (mai ales în timpul nașterii cînd se rupe placenta) și acționează ca antigene care stimulează producerea de anticorpi anti-A. La nașterea următoare anticorpii formați în timpul sarcinii precedente trec în circulația sangvină a fătului, producîndu-i moartea.

Asemenea căsătorii dintre femei cu grupa *0* și bărbați cu alte grupe sangvine se numesc *AB0*-incompatibile.

Există de asemenea o corelație directă dintre grupa sangvină 0 și incidența ulcerului duodenal, persoanele cu grupa sangvină 0 prezentînd o probabilitate de 40% mai mare de a face boala, față de persoanele cu celelalte grupe sangvine.

La om au mai fost descriși și alți loci genici ce specifică și alte antigene ale grupelor sangvine. Așa sînt determinanții genici *M*, *N* și *Rh*.

5. FACTORUL Rh

Studiindu-se asemănarea imunologică dintre sîngele uman și cel al maimuței *Maccacus rhesus*, s-a constatat că serul iepurilor imunizați cu eritrocite de maimuță dă o puternică reacție de aglutinare a eritrocitelor la un număr mare de oameni. S-a admis că oamenii pot conține un factor responsabil de această reacție, factor desemnat *Rh* de la denumirea speciei de maimuță. Ulterior s-a dovedit că factorul este ereditar și reprezintă alelele rh^+ (*Rh*) și *rh* (Rh^-) ale aceleiași gene implicate în determinismul reacției imunologice. Alela dominantă rh^+ (*Rh*) condiționează reacția de aglutinare, pe cînd alela recesivă *rh* (Rh^-) nu determină reacția de aglutinare. Oamenii pot avea deci *Rh* pozitiv și *Rh* negativ. Cînd cuplurile parentale sînt homozigote, nu apar probleme de aglutinare și descendenții se nasc normal. Complicațiile apar însă atunci cînd tata are *Rh* pozitiv iar mama

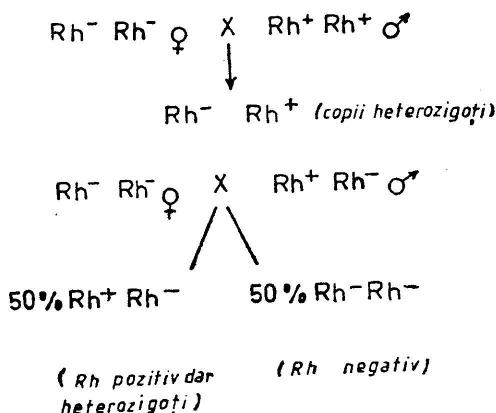


Fig. 49. **Transmiterea factorului Rh.**

Rh negativ fig 49. În acest caz se nasc copii heterozigoţi ($rh^+ rh^+ \, x rh^- \; rh^- = rh^+ rh^-$). La prima sarcină, antigenul specificat de factorul rh^- al fătului heterozigot pătrunde în circulaţia sangvină a mamei şi determină aici formarea de anticorpi anti—*Rh*. Anticorpii apoi pătrund în circulaţia sangvină a fătului. Viaţa acestui, dacă e vorba de prima sarcină nu este periclitată, dat fiind faptul că titrul anticorpilor nu este prea ridicat. Prima naştere se desfăşoară normal. La a doua naştere însă, embrionul heterozigot (rh^+rh^-) determină şi de această dată, prin prezenţa factorului rh^+, sinteză de anticorpi anti—*rh* în organismul matern. Titrul anticorpilor anti—*Rh* sintetizaţi la a doua naştere se adaugă aceluia realizat la prima naştere, dublîndu-se. Mama este imunizată faţă de antigenul rh^+ de la sarcina precedentă prin anticorpii deja prezenţi în corpul său. Dar aceşti anticorpi pătrund în circulaţia sangvină a fătului şi, fiind în cantitate mare, determină o puternică reacţie de aglutinare a eritrocitelor fătului. Această reacţie de aglutinare stă la baza maladiei *eritroblastosis foetalis*, în urma căreia fătul moare.

Accidentele de eritroblastoză pot fi prevenite fie prin transfuzii masive de sînge prin care se înlocuieşte o parte din sîngele matern, reducîndu-se astfel titrul anticorpilor, fie prin scoaterea fătului cu mult timp înainte de termenul naşterii (corespunzînd perioadei în care titrul anticorpilor creşte exponenţial) şi creşterea lui în incubator.

Sînt încă dispute privind natura *locusului Rh*. Unii admit că este vorba de un singur locus genic cu mai multe alele, pe

cînd alții consideră că în determinarea acestei reacții de tip antigen-anticorp intervin mai multe gene strîns lincate (sistemul *c d e*), fiecare cu o alelă dominantă și alta recesivă. Alela recesivă rh este cea mai frecventă (55%) în populația bască a Spaniei. În Europa, frecvența genei *rh* este de 40%, în Africa de 23% iar la negrii americani 28%. Alela este foarte puțin frecventă sau chiar absentă în populația chineză și japoneză ca și în populațiile indiene ale Americii și Australiei.

Alela rh^+ are o distribuție mai neregulată, prezentînd totodată mai multe tipuri. De exemplu, tipul Rh^0 sau *cDe* are o frecvență de 5% în populațiile europene, chineze, indiene americane și aborigene australiene și 60% la negrii africani și pigmei. Un alt tip, *Rh* 1 sau *CDe* are o frecvență de 55% în populația europeană și 60% în populațiile asiatice, 58% în populația de aborigeni australieni și numai 25% în populațiile africane și indiene americane.

Persoanele cu *Rh* negativ produc anticorpi față de celulele roșii *Rh* pozitive, dar nu are loc și o reacție reversă.

Un interesant fenomen de *polialelie* a fost descris la *Drosophila melanogaster*, la care diferitele nuanțe ale culorii ochilor sînt determinate de o serie polialelă. Astfel, tipul sălbatic are ochi de culoare roșie, nuanță determinantă de gena dominantă w^+. Diferitele nuanțe ale culorii ochilor, altele decît culoarea roșie, se manifestă recesiv față de culoarea roșie a tipului normal. Așa sînt culoarea *coral*, determinată de alela w^{co}, culoarea sîngerie (*blood*), determinată de alela w^{bl}, culoarea *eosină* (w^e), cireșie (*cherry* — w^{ch}), *honey* (w^h), *buff* (w^{bf}), *tinged* (w^t), *pearl* (w^p) și *ivory* (w^i). Alela *w* este recesivă față de toate aceste alele, descrise mai sus și determină în stare homozigotă (w/w) culoarea albă (*white*) a ochilor la drosofilă, ea condiționînd absența oricărui pigment pentru culoarea ochilor.

Celelalte alele condiționează producerea unor cantități variabile de pigment, ele fiind recesive față de alela w^+ dar dominante unele față de altele, ordinea descrescîndă a dominanței fiind:

$$w^+ \rightarrow w^{co} \rightarrow w^{bl} \rightarrow w^e \rightarrow w^{ch} \rightarrow w^h \rightarrow w^{bf} \rightarrow w^t \rightarrow w^p \rightarrow w^i \rightarrow w.$$

Culoarea ochilor la om este tot un caracter determinat prin alelism multiplu. Seria polialelă în acest caz redată în sensul descreșterii dominanței este următoarea:

E^b (ochi negri) $\rightarrow E^{gr}$ (ochi căprui-verzui) $\rightarrow E^{bl}$ (ochi albaștri)

$E^b - E^{gr}$ (ochi negri cu reflexe verzui)

6. VARIANTELE ELECTROFORETICE ȘI SEMNIFICAȚIA LOR

Electroforeza s-a dovedit a fi o metodă foarte utilă în studiul genetic al populațiilor, în stabilirea relațiilor interalelice și în studiul fenotipului, la nivel molecular.

Principial ea se bazează pe faptul că moleculele care prezintă o anumită încărcătură electrică, suspendate într-un mediu conductor de electricitate vor migra în cîmpul electric spre polii acestuia, în funcție de natura încărcăturii lor. Mediul conductor constă din tampon menținut într-un mediu de susținere poros precum hîrtia de filtru, acetat de celuloză sau gel agar, amidon sau poliacrilamidă. Moleculele identice migrează cu aceeași rată și după o perioadă dată de timp se vor concentra într-un același punct în mediu formînd o bandă distinctă, bine delimitată. Datorită structurii sale particulare în aminoacizi, fiecare proteină are pe de o parte o formă și o dimensiune caracteristică, iar pe de alta o încărcătură electrică netă pozitivă sau negativă. Într-un cîmp electroforetic, are loc o separare clară a diferitelor tipuri de molecule proteinice. Mobilitatea electroforetică reprezintă un criteriu fenotipic de studiu al structurii genetice și variabilității, iar puterea sa de rezoluție este atît de mare încît pot fi decelate diferențe dintre două peptide de ordinul a numai un aminoacid. O proteină constă dintr-o singură catenă polipeptidică (*monomer*), din două catene polipeptidice (*dimer*), din trei (*trimer*), patru (*tetramer*) sau mai multe catene polipeptidice (*multimer*). Fiecare catenă polipeptidică este sintetizată de cîte o alelă. O proteină multimerică poate fi formată din catene polipeptidice identice sau neidentice. Dacă are loc omogenizarea drosofilelor omorîte într-o soluție tampon și omogenatul este supus electroforezei, se poate studia modelul electroforetic al unor enzime cum ar fi enzimele esterazice specificate de locusul *est-6*. S-a constatat că anumite stocuri de musculițe diferă prin mobilitatea electroforetică a esterazelor, unele prezintă esteraze ce se deplasează rapid într-o unitate dată de timp, formînd o bandă numită „F“ de la cuvîntul englez „fast“. Genotipul unor asemenea musculițe este considerat a fi *FF*. Alte stocuri de musculițe au un tip de *esterază-6* care se deplasează încet în aceeași perioadă de timp, formînd o bandă numită „S“ (de la slow) avînd genotipul *SS*. În urma unei încrucișări *FF* × *SS* rezultă în F_1 indivizi heterozigoți (*FS*) care prezintă ambele modele electrofore-

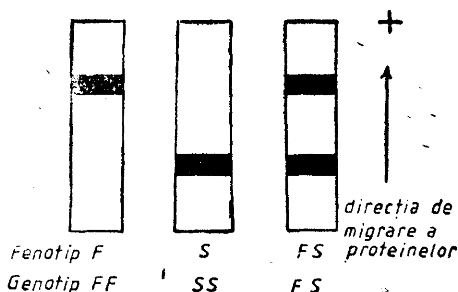


Fig. 50. **Reprezentarea diagramatică a fenotipurilor electroforetice privind enzima esterază — 6 la D. melanogaster (din Levine, 1973).**

tice pentru enzimă, nefiind o combinație dintre diferite unități proteinice sau subunități produse de fiecare alelă (fig. 50). Rezultă că după modelul electroforetic, enzima esterază-6 este o proteină monomerică. Faptul că la heterozigoți apar ambele modele electroforetice corespunzătoare atît alelei *F* cît și alelei *S* înseamnă că este vorba de o relație de codominanță dintre cele două alele. Studiul electroforetic al fosfatazei alcaline la drosofilă a relevat apariția în F_1 a unei benzi de mobilitate intermediară *FS* care reprezintă de fapt o proteină hibridă. S-a apreciat că enzima este un dimer care în stare homozigotă este reprezentată de catene polipeptidice identice, pe cînd în stare heterozigotă poate fi formată fie din subunități identice, fie din subunități neidentice. De asemenea formarea unei benzi intermediare, suplimentare benzii *F* și benzii *S*, indică existența unei relații de codominanță dintre alele. Descoperirea unei alele *O* care condiționează absența oricărei benzi pe coloana electroforetică indică existența, în determinismul genetic al fosfatazei alcaline, a unei serii polialele (*F*, *S* și *O*).

Din combinația $S \times O$ rezultă un fenotip *SO* în care se manifestă un fenomen de dominanță incompletă.

Electroforeza a devenit astfel un excelent mijloc de decelare indirectă a genotipului prin analiza fenotipului la nivel molecular.

Tot un caz de polialelie se întîlnește și în determinismul genetic al culorii blănii la iepuri de casă și a fost evidențiat prin încrucișări dialele între iepurele albino (*cc*) complet lipsit de pigment melanic, himalaian ($c^h c^h$) de culoare albă, dar cu extremitățile de culoare neagră și chinchilla ($c^{ch} c^h$) de culoare gri și tipul sălbatic (*CC*) de culoare neagră. Alela *C* este dominantă față de toate celelalte alele (tabelul 9). Ierarhia dominanței este $C \; c^{ch} \; c^h \; c$.

Tabelul 9

Seria de alele pentru pigmentarea blănii la iepuri

Fenotipuri	Genotipuri posibile
negru	CC, Cc^{ch}, Cc^{h}, Cc
Chinchilla	$c^{ch}c^{ch}$
gri deschis	$c^{ch}c^{ch}$, $c^{ch}c$
himalaian	$c^{h}c^{h}$, $c^{h}c$
albino	cc

7. INTERACŢIUNEA GENELOR

Sînt numeroase cazurile în care pentru exteriorizarea unui singur caracter colaborează mai multe perechi de gene din interacţiunea cărora pot apare în F_1 caractere cu totul noi, iar în F_2 apar alte raporturi de segregare ce se abat aparent de la raporturile mendeliene. Perechile de gene care interacţionează, nu ocupă acelaşi locus pe cromozomi omologi, ci ele sînt plasate fie în loci diferiţi pe acelaşi cromozomi sau în cromozomi diferiţi, neomologi. Asemenea gene sînt nealele.

Interacţiunea genelor nealele poate schimba uneori felurile fenotipului fără a schimba numărul fenotipurilor. De asemenea cînd două perechi de gene nealele afectează acelaşi caracter, numărul fenotipurilor poate fi mai mic decît numărul genotipurilor. Genele nealele pot interacţiona contribuind prin catenele polipeptidice pe care le specifică la alcătuirea unei molecule complexe care serveşte ca produs genic funcţional. Holoenzima transcriptazei de la E. coli ($\alpha_2\beta\beta'\sigma\omega$) este codificată de 5 gene nealele α, β, β', ω şi σ . La fel, enzima lactic dehidrogenaza de la om şi alte animale reprezintă un tetramer (A_2B_2), cele patru catene polipeptidice fiind specificate de două gene nelincate A şi B, care codifică catene de aceeaşi lungime, dar care au secvenţe diferite de aminoacizi. Se pot produce cinci tipuri de molecule de *lactic dehidrogenază* care diferă în reacţia lor faţă de diferite substraturi A_4, A_3B_1, A_2B_3 şi B_4. Iată deci că doi loci produc în mod normal 5 produşi funcţionali. Se cunosc însă şi alele rare ale locilor *A* şi *B* şi indivizi hibrizi care pot forma 12 tipuri diferite de lactic dehidrogenază. Un al treilea

locus *C* codifică o altă polipeptidă care intră în alcătuirea enzimei lactic dehidrogenază din testicule și spermatozoizi, crescînd numărul potențial de lactic-dehidrogenaze diferite ce se pot forma în țesuturile germinale. În acest caz interacțiunile genice apar imediat după traducere, înainte ca produsul genic să fie pus în circuitul metabolic.

Diferiți loci nealelici care codifică același produs sau un produs similar se numesc *izoloci*. Nonalelele de la nivelul izolocilor se numesc *izogene*.

În cazul enzimei lactic dehidrogenaza pot interacționa trei izoloci spre a produce mai multe izoenzime similare lacticdehidrogenazice care s-au numit *isozime*.

Izoloci sub forma a două perechi de gene duplicate sînt implicați în determinarea pigmentației pielii la om și a cariopsei la grîu ca și a pigmentației unor flori.

Tipurile de ARN*t* și ARN*r* pot fi codificate de izoloci. La *E. coli* se pare că există gene unice pentru fiecare tip de ARN*t*. La drosofila există circa 60 izoloci pentru ARN*t* reprezentînd circa 750 gene, localizate în circa 100 situri în tot genomul. Există deci în medie circa 12 izoloci pentru fiecare tip de ARN*t*.

Un caz de interacțiune a genelor fără a se modifica raportul de segregare, dar care duce la apariția de fenotipuri noi a fost întîlnit la încrucișarea dintre rasa de găini *Wyandotte* cu creasta tip „trandafir" și rasa de găini *Brahmas* cu creasta tip „mazăre". Cele două caractere sînt dominante față de tipul „creastă simplă" întîlnit la rasa *Leghorn*.

Bateson și Punnett au admis că tipul de creastă este determinat de interacțiunea a două gene nealele *R* și *p*.

$$RRpp \times rrPP$$

Wyandotte *Brahmas*

RrPp

creastă „nucă"

Din interacțiunea genelor dominante R și P apare un nou fenotip-creasta „nucă" iar din interacțiunea genelor recesive *r* și *p* apare alt nou fenotip, creasta simplă.

$RrPp \times RrPp$

9/16 RP creastă „nucă"
3/16 Rp creastă „trandafir"
3/16 rP creastă „mazăre"
1/16 rp creastă simplă

Se cunosc însă și cazuri de interacțiune genică în care are loc atît schimbarea raportului de segregare cît și apariția de fenotipuri noi. Acestea sînt complementaritatea, epistazia și polimeria.

8. COMPLEMENTARITATE GENICĂ

Este fenomenul prin care, din interacțiunea a două sau mai multe gene nealele rezultă o expresie fenotipică diferită de aceea determinată de fiecare genă în parte. Genele complementare pot fi dominante sau recesive.

Se deosebește o complementaritate dominantă și o complementaritate recesivă. În cazul *complementarității dominante* este vorba de o interacțiune dintre gene nealele în care exprimarea unui anumit caracter necesită prezența concomitentă a două sau mai multe alele dominante. Astfel, Bateson și Punnett au încrucișat două varietăți de *Lathyrus odoratus* cu flori albe și au obținut în F_1 plante cu flori roșii. Aceste plante din F_1, autopolenizate au dat o descendență în F_2, care a segregat în raportul de 9 roșii la 7 albe. Simbolizată, experiența arată astfel:

$$\underset{\text{albă}}{AAbb} \times \underset{\text{albă}}{aaBB}$$

$$F_1 \ \underset{\text{roșii}}{AaBb}$$

$$AaBb \times AaBb \rightarrow \begin{array}{ll} 9/16\ AB & 9 \text{ roșii} \\ \left.\begin{array}{l} 3/16\ Ab \\ 3/16\ aB \\ 1/16\ ab \end{array}\right\} & 7 \text{ albe} \end{array}$$

Pentru apariția culorii roșii a petalelor, este necesară interacțiunea a două gene nealele dar în stare dominantă, A și B. Toate combinațiile în care în stare dominantă apare doar una din aceste gene nealele condiționează culoarea albă a petalelor. De asemenea, culoarea albă este determinată și de alelele recesive ale acestor gene nealele.

Abaterea de la raportul mendelian de segregare este numai aparentă. Altfel, chiar și acest fenomen de complementaritate confirmă legile mendeliene ale segregării.

Există şi o *complementaritate recesivă,* în care manifestarea unui anumit caracter necesită prezenţa concomitentă a două sau mai multe gene nealele, recesive. Acest tip de interacţiune genică a fost observat cînd s-a studiat ereditatea formei capsulelor de la traista ciobanului (*Capsella bursa-pastoris*). Încrucişîndu-se o varietate cu capsulă triunghiulară cu o varietate cu capsula ovoidă se obţin în F_1 plante cu capsule triunghiulare. În F_2 apare un raport de segregare de 15/16 plante cu capsula triunghiulară şi 1/16 plante cu capsula ovoidă. Simbolizînd experienţa se poate scrie:

$A_1 A_1 A_2 A_2$ × $a_1 a_1 a_2 a_2$
triunghiulară ↓ ovoidă

F_1 $A_1 a_1 A_2 a_2$
triunghiulară
↓ autopolenizare

F_2
9/16 $A_1 - A_2 -$
3/16 $A_1 - a_2 a_2$ } 15/15 triunghiulară
3/16 $a_1 a_1 A_2 -$
1/16 $a_1 a_1 a_2 a_2$ } 1/16 ovoidă

Linia (—) semnifică prezenţa fie a alelei dominante (A_1 sau A_2) fie a celei recesive (a_1 sau a_2).

Rezultă că pentru a se exprima caracterul de capsulă ovoidă, trebuie să interacţioneze două gene nealele în stare recesivă (a_1 şi a_2).

S-a constatat că această plantă este un tetraploid prezentînd nu doi cîte doi cromozomi omologi ci patru cîte patru cromozomi omologi pentru fiecare pereche, din care cauză s-a creat posibilitatea duplicării genice prin poliploidie, rezultînd gene similare ca acţiune dar care sînt nealele situate în loci diferiţi, moştenindu-se independent.

9. GENE INHIBITOARE SAU INTERACŢIUNE DOMINANTĂ ŞI RECESIVĂ

Gene inhibitoare dominante au fost observate la numeroase organisme. La păsări, din încrucişarea rasei *Leghorn* (penaj alb), cu rasa *Wyandotte* (penaj alb) se obţine în generaţia F_1 păsări cu penaj alb, iar în generaţia F_2 rezultă o proporţie de

13 alb : 3 colorat. Acest raport care apare ca o excepție de la segregarea mendeliană se datorește faptului că rasa *Leghorn* cu penaj alb posedă, în același timp, gena dominantă C (de la colour), care determină culoarea neagră și o genă inhibitoare *I* care, în stare dominantă, supresează manifestarea genei *C*. Rasa Wyandotte posedă gena *c* (alela recesivă a genei dominante *C*) care determină în fenotip absența pigmentației și gena *i*, alela recesivă inactivă în supresia genei *C*.

În încrucișări cu rase cu penaj colorat, rasa *Leghorn* se comportă ca dominantă pe cînd rasa *Wyandotte* se comportă ca recesivă.

Indivizii de culoare albă apar în toate cazurile în care este prezentă gena *I* ca și în cazurile în care este prezentă alela recesivă *c*. Indivizii cu penaj colorat apar numai în cazul în care gena *C* scapă de controlul genei *I* și este alături de gena *i*.

C C I I Leghorn alb × *c c i i Wyandotte* alb

F_1 *C c I i* (alb)

F_2	9/16	*C c I i*	alb	13 alb : 3 negru
	3/16	*c c I i*	alb	
	3/16	*C c i i*	negru	
	1/16	*c c i i*	alb	

10. GENE EPISTATICE

Cînd două sau mai multe gene acționează asupra aceluiași caracter, o genă poate masca efectul celeilalte gene, cam în aceeași măsură în care efectul unei gene recesive este mascat de alela sa dominantă. Acest fenomen prin care o genă poate masca sau supresa efectul altei gene nealelice (situată într-un alt locus) a fost numit epistazie. Gena epistatică este o genă ce aparține unei perechi de alele, care împiedică manifestarea alelei dominante dintr-o altă pereche de alele. Gena supresată poartă numele de *genă hipostatică*.

Fenomenul de epistazie este implicat în aproape toate tipurile de interacțiune genică. Dominanța implică supresia genică *intra*-alelică (mascarea expresiei unei alele recesive de către alela dominantă din același locus). Epistazia cuprinde supresia genică *inter*-alelică (mascare pe care o exercită un locus genetic asupra expresiei unui alt locus genic). Raportul fenoti-

pic clasic de 9 : 3 : 3 : 1 observat la descendenții unor părinți dihibrizi se modifică datorită epistaziei în raporturi care reprezintă combinații ale acestuia.

Gena epistatică poate fi dominantă sau recesivă.

a) *Gene epistatice dominante* (12 : 3 : 1)

Fenomenul epistaziei dominante a fost observat la o încrucișare între *Avena fatua* cu boabe negre și *Avena sativa* (ovăz cultivat) cu boabe galbene.

AABB (boabe negre) × aabb (boabe galbene)
↓
F_1 *AaBb* boabe negre

F_2 {
12 *AABb* negre
Aabb
3 *aaBb* cenușii
1 *aabb* galben

Cele 12 combinații care conțin gena dominantă *A*, în stare homozigotă sau heterozigotă sînt de culoare neagră; 3 combinații care au gena dominantă *B* în stare homozigotă sau heterozigotă și nu conțin gena *A* sînt de culoare cenușie iar o combinație cu genele recesive *ab* produce boabe galbene.

Din cele de mai sus rezultă că gena dominantă *A* împiedică expresia genei dominante *B* ce determină culoarea cenușie și este deci epistatică pe cînd gena dominantă *B*, a cărei acțiune este inhibată, este hipostatică.

b. *Gene recesive epistatice* (9 : 3 : 4)

Un exemplu de epistazie recesivă ni-l oferă ereditatea culorii blănii la anumite rase de cîini. La încrucișarea o două rase de cîini, una homozigotă albă cu una homozigotă maron, se obțin în F_1 numai descendenți de culoare neagră. Încrucișările indivizilor din F_1 au produs descendenți în raportul de segregare 9 negru : 4 alb : 3 maron, ceea ce se poate demonstra în diagrama de mai jos:

	$BBcc$ (alb)	×	$bbCC$ (maron)
F_1		$BbCc$	(negru)
	9	$BbCc$	negru = 9
	3	$Bbcc$	alb ⎫
F_2	3	$bbCc$	maron = 3 ⎬ 4
	1	$bbcc$	alb ⎭

În acest caz, alelele B și b produc culoarea neagră și respectiv maron, dar numai în prezența alelei dominante (C) de la un alt locus. Pentru a distinge această interacțiune de o relație dominanță și recesivitate, se spune că cc este epistatic față de B sau b; adică homozigoția alelei c previne formarea oricărui pigment, indiferent de alelele pentru alte culori. Efectul pe care alelele cc îl au asupra lui B poartă numele de *epistazie recesivă*.

11. GENE DUPLICATE CU EFECT CUMULATIV (9 : 6 : 1)

Dacă condiția dominantă (fie homozigotă, fie heterozigotă) la unul din loci (dar nu la amîndoi) produce același fenotip, raportul de segregare în F_2 va fi 9 : 6 : 1. De exemplu, unde sînt implicate gene epistatice în producerea anumitor substanțe cum ar fi pigmenții, genotipurile dominante de la fiecare locus pot fi considerate ca producînd în mod independent o unitate de pigment. Astfel, genotipurile A-bb și aaB — produc fiecare cîte o unitate de pigment, avînd deci același fenotip. Genotipul $aabb$ nu produce pigment, dar în genotipul A-B- efectul este cumulativ și în consecință vor produce două unități de pigment (o cantitate dublă).

Se poate constata că atunci cînd epistazia operează între doi loci genici numărul fenotipurilor ce apar la descendenții unor părinți dihibrizi, va fi mai puțin de patru deși segregarea are loc pentru două perechi de gene cu efecte fenotipice diferite. Aceasta se datorește mascării efectului unei gene de către cealaltă, generația F_2 conținînd numai trei clase fenotipice în loc de patru iar în cazul complementarității numărul claselor fenotipice se reduce la două așa cum rezultă din tabelul 10.

Tabelul 10

Cele şase tipuri de raporturi epistatice

	Genotipurile	A—B—	A—bb	aaB—	aabb
	Raportul clasic	9	3	3	1
1	Complementaritate dominantă	15			1
2	Complementaritate recesivă	9	7		
3	Interacţiune dominantă şi recesivă	13		3	
4	Epistazie dominantă	12		3	1
5	Epistazie recesivă	9	3	4	
6	Gene duplicate cu efect cumulativ	9	6		1

Exprimarea în fenotip a genelor

12. PENETRANŢĂ ŞI EXPRESIVITATE GENICĂ

Genotipul reprezintă totalitatea factorilor ereditari (genelor) pe care o specie, un individ îi prezintă în structura sa genetică (genom). Aceste gene se manifestă în anumite condiţii de mediu. Din interacţiunea genotipului cu mediul rezultă fenotipul, care reprezintă totalitatea caracterelor şi însuşirilor (morfologice, biochimice, de comportament etc.) pe care un organism le prezintă la un moment dat, în condiţii determinate de mediu. În interacţiunea complexă genotip-mediu, genotipul determină limitele între care se poate manifesta fenotipul. În fenotipul a doi indivizi ce aparţin aceleiaşi specii pot să apară diferenţe, nu numai determinate de natura genelor, natură care poate fi dominantă sau recesivă, ci şi de variaţia condiţiilor de mediu. Mediul deci poate influenţa raportul fenotipic de segregare. O genă prezentă la toţi indivizii de o anumită categorie genotipică în anumite condiţii de mediu poate să se exprime în fenotip la toţi indivizii, caz în care se spune că manifestă o penetranţă completă sau de 100%, dar în alte condiţii de mediu, deşi prezentă la toţi indivizii, ea nu se manifestă decît la unii dintre ei şi în acest caz se spune că o asemenea genă

are o penetranță incompletă sau are o penetranță sub 100%. Prin penetranță se înțelege deci frecvența cu care o genă sau o combinație de gene este exprimată fenotipic. De exemplu, genele care au fost analizate de Mendel (A, B etc.) prezintă o penetranță completă, ele manifestîndu-se la toți indivizii purtători ai lor, pe cînd genele care condiționează rezistența sau sensibilitatea la boli au penetranță redusă, incompletă, deoarece ele nu se exprimă la toți indivizii, ci doar la aceia care au fost supuși unei infecții caracteristice (aceasta reprezentînd o anumită condiție de mediu).

Penetranța este un fenomen de tip totul sau nimic: penetranță completă sau penetranță incompletă. Un exemplu foarte convingător de penetranță ni-l oferă cazul a doi gemeni monozigoți, deci care au aceeași structură genotipică, dar la care la unul gena pentru „buză iepure" este penetrantă (se exprimă în fenotip) iar la celălalt este nepenetrantă (nu se exprimă în fenotip).

Penetranța incompletă caracterizează multe gene dominante. Schizofrenia este determinată în unele cazuri de două gene dominante cu penetranță incompletă.

Influența mediului se exercită nu numai asupra numărului de indivizi care exprimă în fenotip o anumită genă ci și asupra intensității exprimării în fenotip a acelui caracter, aspect care se numește *expresivitate genică.*

Odată ce gena este penetrantă ea va manifesta frecvent variațiuni în expresia sa fenotipică. De exemplu, polidactilia la om, determinată de o genă dominantă, prezintă expresivități diferite: mîini normale — degete suplimentare la picior, picioare normale — degete suplimentare la mînă, polidactilia apare la mîna dreaptă dar nu la stînga, la stînga dar nu la dreapta, sau la ambele mîini și picioare etc. În condiție heterozigotă (*Pp*) gena polidactiliei are o penetranță de mai puțin de 100% căci uneori ea nu reușește să producă vreun efect fenotipic detectabil.

Nepenetranța unor gene înseamnă 0% expresivitate.

Datorită condițiilor diferite de mediu, aceeași genă poate produce efecte foarte evidente la unii indivizi în timp ce la alți indivizi efecte abia vizibile.

Gena recesivă *vg* care determină caracterul de aripi vestigiale la drosofilă prezintă o expresivitate diferită în funcție de

temperatură: la temperatura camerei apar aripi vestigiale dar care se pot apropia de dimensiunea aripilor normale, pe cînd la temperaturi scăzute apar aripi vestigiale propriu-zise (extrem de mici, rudimente de aripi).

Mediul intrauterin la mamifere, chiar pentru gemeni monozigoți poate fi foarte variabil, din punct de vedere al poziției ocupate de gemeni în uter, al conexiunilor placentale și acestea pot afecta diferit expresivitatea genelor la cei doi gemeni.

Variația expresivității unor gene se poate datora însă și influenței unor alte gene care se numesc *gene modificatoare*, dintre care unele sînt *reducătoare*, slăbind expresia fenotipică a altei gene nealele, iar altele sînt *amplificatoare*, întărind expresia fenotipică a unei alte gene nealelice.

Penetranța și expresivitatea pot altera raporturile cunoscute de segregare și să determine ca adesea fenotipul să nu exprime fidel genotipul. Primul care și-a dat seama de importanța mediului în expresia genică a fost Wilhelm Jahonnsen, cel care de fapt a introdus și noțiunile de genă, genotip și fenotip.

Există și cazuri de imitație fenotipică numită *fenocopie*. În acest caz un același caracter poate fi produs de alele diferite dar care acționează în medii diferite.

Indivizii care diferă genotipic și care sînt diferiți în același mediu pot deveni fenotipic similari cînd condițiile lor de mediu diferă. Astfel, tulpini de *E. coli* his^+ și his^- cresc și respectiv nu cresc pe mediu de cultură lipsit de histidină. Dar tulpina his^- va putea crește ca și tulpina his^+ dacă mediul de cultură conține histidina. Astfel o celulă his^- pe un mediu de cultură care conține histidina este o fenocopie sau o imitație fenotipică a unei celule his^+. Tot astfel un individ uman care suferă de diabet — maladie ereditară care determină producerea unei insuline anormale — dacă ia insulina sub formă de medicament va deveni o fenocopie a persoanelor genetic normale pentru gena insulinei și care nu iau insulină. Există și cazuri de fenocopiere a caracterelor anormale. Astfel, embrionii umani normali ai căror mame au folosit talidomida se vor dezvolta în copii cu diferite malformații care imită (fenocopiază) persoane anormale ce suferă de maladia ereditară *focomelia* cauzată de o singură genă mendeliană în condiție homozigotă.

13. DETERMINISMUL GENETIC AL CARACTERELOR CANTITATIVE

Cercetările lui Mendel s-au referit la analiza unor caractere discrete, discontinui, care se încadrează în clase discrete de tip neted — zbîrcit; galben — verde.

Johansen a cercetat însă modalitatea de transmitere a unor caractere ce prezintă variabilitate continuă, cunoscute drept caractere cantitative. El a lucrat tot pe o plantă autogamă şi anume pe fasole. Dintr-un lot iniţial el a selecţionat 19 boabe de fasole, fiecare avînd o greutate specifică şi le-a cultivat spre a obţine 19 linii de fasole, care în virtutea faptului că fasolea este o plantă autogamă erau pure* şi în ceea ce priveşte caracterul greutăţii. Din fiecare linie de fasole a selectat apoi boabele cele mai uşoare şi boabele cele mai grele pe care le-a cultivat separat. În fiecare an a ales din descendenţa boabelor uşoare, pe cele mai grele pe care de asemenea le-a cultivat separat. Din cele 19 linii pure de fasole sînt reprezentate grafic doar liniile 3, 11, 13, şi 17 (fig. 51A). Comparînd această distribuţie cu distribuţia greutăţii boabelor la genitori, în mod surprinzător acestea erau similare.

Astfel, o plantă ieşită din boabe de 150 mg aparţinînd liniei a 3-a dă naştere prin autofecundare la descendenţi ale căror boabe au o greutate medie de 200 mg aflată între limitele 150 şi 250 mg. O situaţie asemănătoare se înregistrează în celelalte linii. Johansen a atribuit greutatea medie a boabelor ca datorîndu-se constituţiei genotipice, pe cînd variaţiile pozitive sau negative faţă de aceasta ca datorîndu-se fluctuaţiilor de mediu. Din suprapunerea unei multitudini de curbe de distribuţie de-

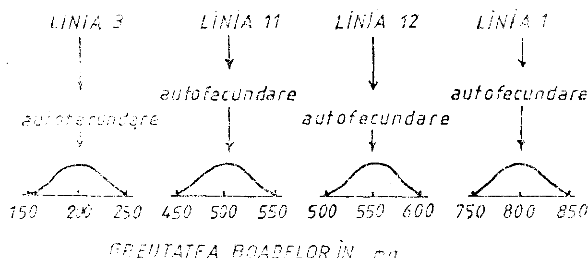


Fig. 51. **A. Selecţia celor patru linii în experienţa lui Johansen (explicaţii în text).**

---

* Linia pură reprezintă totalitatea descendenţilor unei plante autogame homozigote.

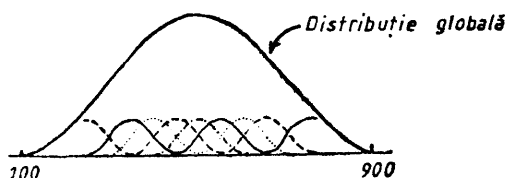


Fig. 51. B. Ineficienţa selecţiei în cadrul liniilor pure (explicaţii în text).

terminată de genotip a rezultat o curbă a distribuţiei normale a frecvenţelor (fig. 51B). Această experienţă a demonstrat că diferitele condiţii de mediu pot produce diferenţe fenotipice între indivizi, dar aceste diferenţe nu se moştenesc.

Greutatea boabelor de fasole apare ca un caracter cantitativ care prezintă o variabilitate de tip continuu, oscilînd de la o valoare minimă la una maximă în cadrul unei populaţii date.

Johansen a tras din experienţele sale o concluzie cu importanţă majoră pentru practica ameliorării plantelor şi animalelor (caracterele cantitative fiind de o excepţională valoare pentru aceasta, referindu-se la caracteristicile de producţie) şi anume că selecţia este ineficientă în cadrul liniilor pure. Selecţia este eficientă numai în cadrul unei populaţii heterogene (cele 19 linii de fasole luate în ansamblu). Dar cercetările sale nu au oferit o rezolvare cu privire la natura genotipurilor care stau la baza celor 19 linii pure diferite.

Observaţiile efectuate de suedezul Nilsson-Ehle (1910) au aruncat o lumină şi asupra acestei probleme.

Încă din 1906, Yule sugerase că variaţiile cantitative continue ar avea la bază o multitudine de gene individuale al căror efect se cumulează, este aditiv. Asemenea idei avusese şi Mendel cînd a fost pus în situaţia de a explica variaţiile în intensitatea culorii roşii la florile de mazăre (de la roşu deschis la roşu închis).

Nilsson-Ehle a stabilit prin experienţe de hidridare la grîu că în determinismul culorii boabelor intervin trei perechi de gene nealele care condiţionează sinteza unei cantităţi anumite de pigment.

Încrucişînd un soi de grîu cu boabe roşii *(AA, BB, CC)* cu un soi cu boabe albe *(aa, bb, cc)* în F_1 se obţin plante care formau boabe de culoare roşie *(AaBbCc)*. Prin autofecundarea indivizilor din F_1 a obţinut în F_2 un raport general de segregare

de 63 roșii la 1 albă. Dar culoarea roșie prezenta diferite nuanțe, sugerînd existența unei segregări pentru trei gene echivalente cu efect cumulativ (aditiv) fig. 52.)

Se deduce că apariția culorii roșii este determinată de trei perechi de gene nealele cu efect cumulativ ,*AA*, *BB* *CC*, iar culoarea albă de alelele lor *aa*, *bb*, *cc*. Nilsson-Ehle a tras concluzia că numărul total al alelelor dominante a celor trei perechi de gene determină *gradul* de pigmentare. Cu alte cuvinte fiecare genă dominantă poate fi considerată cu o contribuție de o doză la culoare roșie iar efectul fiecărei doze este *egal* și *aditiv*.

Lăsînd la o parte a treia pereche de gene, se poate calcula probabilitatea de a obține 0, 1, 2, 3 și 4 doze ale alelelor dominante din încrucișarea *AaBb* × *AaBb* așa cum rezultă din fig. 53.

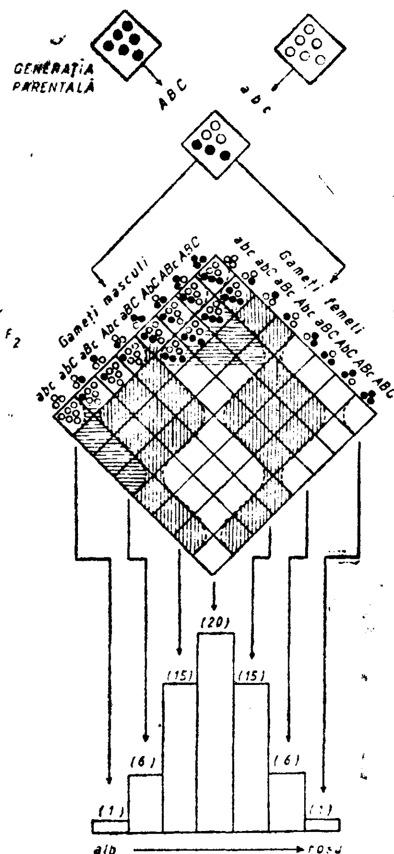


Fig. 52. Segregarea caracterelor în cazul încrucișării a două soiuri de grîu ce diferă prin trei, perechi de gene care determină culoarea boabelor. Distribuția frecvenței culorilor este prezentată în histogramă (după Strickberger, 1976).

Observațiile făcute de Nilsson-Ehle pot fi explicate prin prezența genelor duplicate, avînd în vedere faptul că grîul este o plantă hexaploidă, la care, deci, fiecare locus este reprezentat prin 3 perechi de alele, ceea ce distinge însă aceste rezultate de cazurile simple de complementaritate recesivă este faptul că, în abesnța dominanței, segregarea nu duce la apariția a numai două clase fenotipice, ci caracterul culoarea boabelor se comportă asemănător unui caracter cantitativ.

Pentru A	Pentru B	Pentru A și B	Numărul total al „dozelor" dominante	Probabilitatea totală
	BB = 1/4	AABB = 1/16	4 (roșu foarte închis)	1/16
AA = 1/4	Bb = 1/2	AABb = 1/8	3 (roșu închis)	4/16
	bb = 1/4	AAbb = 1/16		
	BB = 1/4	AaBB = 1/8		
Aa = 1/2	Bb = 1/2	AaBb = 1/4	2 (roșu)	6/16
	bb = 1/4	Aabb = 1/8		
	BB = 1/4	aaBB = 1/16	1 (roșu pal)	4/16
aa = 1/4	Bb = 1/2	aaBb = 1/8		
	bb = 1/4	aabb = 1/16	0 (alb)	1/16

Fig. 53. Segregarea caracterelor în cazul încrucișării unei varietăți de grîu cu boabe roșii cu o varietate de grîu cu boabe albe. Raport de segregare: 15 (1 : : 4 : 6 : 4) : 1.

Prezența fiecărei gene se face simțită în schimbarea gradată a fenotipului, genele cumulîndu-și efectele parțiale. Ideea unui efect de aditivitate cantitativă a genelor asupra fenotipului (adesea numită ereditate cantitativă) a fost o idee revoluționară, ea furnizînd baza genotipică pentru curba normală adesea găsită la variațiile caracterelor cantitative cum ar fi înălțimea, greutatea, culoarea etc.

Williams (1964) prezintă un interesant exemplu de polimerie aditivă la porumb, al cărui endosperm are o constituție triploidă (rezultat din fecundarea nucleului secundar al sacului embrionar care este 2 *n* de către unul din nucleii spermatici (n). Relația dintre numărul dozelor din gena *Y*, care condiționează culoarea galbenă a endospermului și conținutul în vitamina A al acestuia și gena *y* care determină culoarea albă a endospermului este redată în tabelul 11.

Tabelul 11

Corelația dintre numărul de alele Y și conținutul de vitamină A în endospermul porumbului (din Giosan și Săulescu, 1972)

Doze de Y	Genotipul	Vit. A (unități la gram)
0	yyy	0,05
1	yyY	2,25
2	yYY	5,00
3	YYY	7,50

Se cunosc foarte multe cazuri de polimerie cu situații similare celor descrise mai sus, dar probabil cea mai familiară este aceea a pigmentației pielii la om în care participă cel puțin patru perechi de gene (gene cuadruplicate). Presupunîndu-se dominanța genelor care produc pigmentație și aditivitatea simplă a fiecărei alele dominante, se cunosc nouă clase diferite de pigmentație în care numărul genelor dominante este cuprins între 0 și 8.

Cazul simplificat al pigmentației pielii la om este redat de formulele genotipice $P_1P_1P_2P_2$ pentru negri; $P_1p_1P_2p_2$ pentru mulatri tipici și $p_1p_1p_2p_2$ pentru albi, din care rezultă că în determinismul acestui caracter cantitativ (determinat în ultimă instanță de cantitatea de pigment melanic sintetizată în melanofori) intervin două perechi de gene nealele P_1p_1 și P_2p_2 și că intensitatea pigmentației este cu atît mai mare cu cît mai multe alele dominante intră într-o constituție genotipică dată. Din căsătoria unui negru ($P_1P_1P_2P_2$) cu o femeie albă ($p_1p_1p_2p_2$) rezultă copii mulatri. Din căsătoria a doi mulatri ($P_1p_1P_2p_2 \times \times P_1p_1P_2p_2$) va rezulta o descendentă în care apare o segregare într-un raport diferit de cel mendelian în cazul dihibridării și anume 1 negru ($P_1P_1P_2P_2$) 4 mulatru închis ($P_1P_1P_2P_2$ sau $P_1p_1P_2P_2$), 6 mulatru tipic ($P_1p_1P_2p_2$), 1 alb ($p_1p_1p_2p_2$).

Se poate deci conchide că bazele geneticii mendeliene pot explica ereditatea caracterelor cantitative (care se prezintă cu o variație continuă) prin acțiunea unui număr mare de gene (polimerie sau poligenie).

14. GENE LETALE

În 1905 geneticianul francez Cuénot a studiat o varietate de șoareci cu blana galbenă în contrast cu șoarecii cu blană cenușie ce reprezintă tipul sălbatic. Prin încrucișarea șoarecilor galbeni cu șoareci cenușii dintr-o linie pură, el a observat un raport de segregare 1 : 1. Aceasta sugerează că alela pentru blana galbenă este dominantă asupra alelei pentru blana cenușie. În urma încrucișării între ei a șoarecilor galbeni, Cuénot a regăsit descendenții galbeni și cenușii în raportul 2 : 1, o deviere clară de la proporția mendeliană de 3 : 1. Aceasta l-a dus la concluzia că șoarecii galbeni sînt heterozigoți. Raportul de

segregare de 2 : 1, în loc de 3 : 1 arată că 1/4 din indivizi au dispărut şi anume homozigoţii dominanţi.

Y/+		×	Y/+	
Y/Y	Y/+		Y/+	+/+
neviabili	galben		galben	agouti
25%		50%		25%

Segregarea genei pentru culoare galbenă (Y) la şoarece, într-o încrucişare Y/+ × Y/+

De fapt, raportul 1:2:1 este transformat în raportul 2:1 prin moartea clasei homozigote galbene în uter.. Trebuie de remarcat că gena *Y* este *dominantă* prin efectele fenotipice asupra culorii blănii, în plus ea este şi *recesivă* în efectul letal, deoarece alela trebuie să fie homozigotă pentru a determina moartea fătului. Se spune că gena *Y* este dominantă vizibil şi recesivă letal. Efectele acestei gene sînt *pleiotropice* adică gena are un efect fenotipic multiplu asupra culorii şi asupra viabilităţii.

În afară de letalitatea de dominanţă, în natură se întîlneşte şi o *letalitate de recesivitate* descoperită de Baur (1930) la *Antirrhinum majus* var : *aurea*. În urma autofecundării are loc în F_1 următoarea segregare: 1/3 plante cu frunze verzi, 1/3 plante cu frunze verde-pal şi 1/3 plante cu frunze galbene, aşa cum rezultă din tabelul 12.

Tabelul 12

Letalitatea de recesivitate la Antirrhinum

Genotipul	Fenotipul
CC	verde (normal)
Cc	verde pal (aurea)
cc	gălbui (letal)

Cantitatea de clorofilă la Antirrhinum este controlată de către o genă recesivă incompletă care manifestă un efect letal în stare homozigotă şi un efect fenotipic distinct în stare heterozigotă.

Penetranța genelor letale fie recesive fie dominante poate să varieze, astfel că nu toți indivizii afectați genotipic vor fi letali fenotipic. Anumite gene letale au un înalt grad de penetranță și expresivitate, permițînd un mic procent de supraviețuire sau chiar deloc (penetranță 100%) printre genotipurile afectate în stadiul embrionar sau postembrionar. Alte gene numite *semiletale* sau subvitale permit supraviețuirea unei proporții mai mari de genotipuri afectate (50%—30%). Se vede deci că vitalitatea este un caracter influențat de un spectru larg de gene, care variază de la letalitatea completă la subletal, la subvital, apoi normal și în mod ocazional la supervital sau la genotipuri superioare celor medii. Dar, ca regulă, genele letale sînt considerate acelea ale căror efecte cauzează moartea organismului, în mod obișnuit, în primele stadii de dezvoltare, oricum înainte de reproducere.

15. PLEIOTROPIA

Reprezintă un fenomen genetic opus polialeliei. El se înregistrează atunci cînd o singură genă nu controlează expresia unui singur caracter, ci a mai multor caractere. Pleiotropia ar putea fi definită ca efectul fenotipic multiplu al unei singure gene.

La mazăre, chiar Mendel a constatat că perechea de gene care determină culoarea florii acționează și asupra culorii semințelor și asupra prezenței sau absenței petelor roșietice de pe stipele.

La drosofilă, gena *vg* care determină forma vestigială a aripilor, controlează în același timp și alte caractere precum distribuția perișorilor pe partea dorsală, modificarea spermatecii, ducînd și la reducerea vitalității și fecundității.

La mamifere, incluzînd omul, gena care este implicată în albinism, afectează de asemenea văzul și auzul. În acest caz toate sectoarele corpului care sînt afectate au o origine comună în dezvoltarea embrionară timpurie și anume ectodermică. Astfel la om, în cazul *sindromului Lobstein,* este implicată o

genă care determină deopotrivă surditatea, fragilitatea vaselor şi modificări ale scleroticii.

Nu este exclus ca marea majoritate a genelor să se manifeste pleiotropic, aspect care este izvorît din caracterul de integralitate al celulei, respectiv al individului biologic care, funcţionînd ca sistem unitar şi avînd o stare alterată într-unul din componentele sale subordonate, prezintă alterări şi în alte elemente în urma interacţiunilor structural-funcţionale.

Redactor: ADRIAN GRĂNESCU
Tehnoredactor: CONSTANTIN RUSU

Apărut: 1981. Bun de tipar: 25.09.1981. Comanda nr. 2103
Coli de tipar: 12,25. Hîrtia: velină 90 g/mp. Format: 61×86/16

Tiparul executat sub comanda nr. 312/1981
la Întreprinderea Poligrafică Cluj,
Municipiul Cluj-Napoca
B-dul Lenin nr. 146
Republica Socialistă România

